

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Antropologie a genetika člověka



Bc. Iveta Procházková

Genetická determinace diabetu druhého typu,
analýza vybraných genů – *THADA*, *MAEA*, *JAZF1* a *ARAP1*

Genetic determination of type 2 diabetes mellitus,
analysis of selected genes – *THADA*, *MAEA*, *JAZF1* and *ARAP1*

Diplomová práce

Vedoucí práce: Ing. Jaroslav Hubáček, CSc., DSc.

Praha, 2017

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 28.4.2017

.....

Bc. Iveta Procházková

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Ing. Jaroslavu Hubáčkovi, CSc., DSc. a všem z Laboratoře pro výzkum aterosklerózy v IKEM za jejich trpělivost, ochotu a cenné rady. Dále děkuji také své rodině a přátelům za jejich podporu a pomoc během celé doby mého studia.

Abstrakt

Úvod: Diabetes mellitus druhého typu (T2DM) je celosvětově rozšířené civilizační onemocnění, jehož prevalence neustále narůstá. Ačkoli je pravděpodobnost jeho manifestace spojována především s environmentálními faktory, i genetické předpoklady hrají významnou roli. Cílem naší práce bylo zjistit souvislost 4 polymorfismů s rizikem vzniku T2DM u české populace. Polymorfismy rs10203174 *THADA*, rs6819243 *MAEA*, rs849135 *JAZF1* a rs1552224 *ARAPI1* (*CENTD2*) jsme vybrali na základě jejich rizikovosti v britské populaci.

Metodika: Studovali jsme skupiny celkem 712 českých pacientů s T2DM a 752 zdravých kontrol, vybraných jako náhodný vzorek české populace ve studii post-MONICA. Genotypizace rs10203174 a rs6819243 probíhala analýzou PCR–RFLP. Analýza genotypů rs849135 a rs1552224 byla provedena pomocí real-time PCR. Výsledky byly analyzovány výpočtem odds ratio (OR) a chí-kvadrátu.

Výsledky: Pro variantu rs1552224 se podařilo statisticky významně ($P = 0,01$) prokázat její rizikovost. Hodnota OR pro rizikovou alelu T je 1,37 (95% CI 1,07 – 1,75). U polymorfismů rs10203174, rs6819243 a rs849135 žádná signifikantní závislost s onemocněním nebyla prokázána. Pro rs10203174 je hodnota OR alely C 1,20 (95% CI 0,91 – 1,56, $P = 0,20$), OR alely T polymorfismu rs6819243 je 1,12 (95% CI 0,71 – 1,77, $P = 0,61$) a pro rs849135 odpovídá OR alely A hodnotě 1,03 (95% CI 0,76 – 1,38, $P = 0,86$).

Závěr: Na rozdíl od britské populace varianty rs10203174, rs6819243 a rs849135 u české populace významně neovlivňují riziko manifestace T2DM. Rs1552224 TT homozygoti mají 1,4x zvýšenou pravděpodobnost vzniku onemocnění.

Klíčová slova

Diabetes mellitus 2. typu, genetické predispozice, genetické studie, SNP

Abstract

Introduction: Type 2 diabetes mellitus (T2DM) is a worldwide spread disease of affluence which prevalence has been growing. Although, the probability of its manifestation is being linked above all with environmental factors, genetic susceptibility plays an important role too. The aim of this thesis was to find out the association of four polymorphisms with the risk of T2DM manifestation in Czech population. Polymorphisms rs10203174 *THADA*, rs6819243 *MAEA*, rs849135 *JAZF1* and rs1552224 *ARAP1* (*CENTD2*) were chosen based on their risk in British population.

Methodology: We studied groups of 712 Czech patients with T2DM and 752 healthy controls selected as a random sample of Czech population in the post-MONICA study. For a genotyping rs10203174 and rs6819243 we used the PCR–RFLP method. For an analysis of genotypes rs849135 and rs1552224 was used the real-time PCR method. The results were analysed via odds ratio (OR) a chi-square test.

Results: In case of the rs1552224 variant, the risk was proved with statistical significance ($P = 0,01$). The value of OR for the risk allele T is 1,37 (95% CI 1,07-1,75). In case of the polymorphisms rs10203174, rs6819243 and rs849135 no significant association with the disease was proved. For rs10203174 the value of OR of the allele C is 1,20 (95% CI 0,91-1,56, $P = 0,20$), OR of the allele T polymorphism rs6819243 is 1,12 (95% CI 0,71-1,77, $P = 0,61$) and for rs849135 the OR of allele A is 1,03 (95% CI 0,76-1,38, $P = 0,86$).

Conclusions: In contrast to British population, the variants rs10203174, rs6819243 and rs849135 in Czech population do not significantly influence risk of the manifestation of T2DM. Rs1552224 TT homozygotes have a 1,4times heightened probability of the disease occurrence.

Key words

Type 2 diabetes mellitus, genetic predisposition, genetic studies, SNP

Seznam použitých zkratk

AA	acrylamide	akrylamid
ADP	adenosine diphosphate	adenosindifosfát
AMP	adenosine monophosphate	adenosinmonofosfát
ATP	adenosine triphosphate	adenosintrifosfát
ARF	ADP–ribosylation factor	ADP–ribosylační faktor
BMI	body mass index	body mass index
bp	base pair	páry bází
CI	confidence interval	konfidenční interval
DNA	deoxyribonucleic acid	deoxyribonukleová kyselina
GDM	gestational diabetes mellitus	gestační diabetes mellitus
HLA	human leucocyte antigen	lidský leukocytární antigen
HWE	Hardy–Weinberg equation	Hardy–Weinbergova rovnováha
IFG	impaired Fasting Glucose	zvýšená glykémie nalačno
IGT	impaired Glucose Tolerance	porucha glukózové tolerance
IKEM	Institute for Clinical and Experimental Medicine	Institut klinické a experimentální medicíny
LADA	latent autoimmune diabetes in the adult	latentní autoimunitní diabetes dospělých
MODY	maturity-onset diabetes of the young	monogenně dědičný diabetes
oGTT	oral glucose tolerance test	orální glukózový toleranční test
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man	
OR	odds ratio	
PCR	polymerase chain reaction	polymerázová řetězová reakce
RFLP	restriction fragment length polymorphism	polymorfismus délký restrikčních fragmentů
rpm	revolutions per minute	otáčky za minutu
SNP	single nucleotide polymorphism	jednonukleotidový polymorfismus
T1DM	type 1 diabetes mellitus	diabetes mellitus 1. typu
T2DM	type 2 diabetes mellitus	diabetes mellitus 2. typu
WHO	World Health Organization	Světová zdravotnická organizace

Obsah

1.	Úvod.....	9
2.	Diabetes mellitus.....	10
2.1.	Diabetes mellitus 2. typu.....	10
2.1.1.	Patofyziologie.....	10
2.1.2.	Diagnostika.....	11
2.1.3.	Komplikace.....	11
2.1.4.	Léčba.....	12
2.1.5.	Epidemiologie.....	13
2.2.	Další typy diabetu.....	15
2.2.1.	Diabetes mellitus 1. typu.....	15
2.2.2.	Gestační diabetes mellitus.....	15
2.2.3.	Méně časté typy diabetu.....	16
2.3.	Predispoziční faktory pro T2DM.....	17
2.3.1.	Environmentální faktory.....	17
2.3.1.1.	Intrauterinní vývoj.....	17
2.3.1.2.	Životní styl.....	17
2.3.1.3.	Neovlivnitelné faktory.....	19
2.3.2.	Genetické faktory.....	20
2.3.2.1.	Vyšetřované geny.....	21
2.3.3.	Epigenetické faktory.....	23
3.	Cíle práce.....	25
4.	Hypotézy.....	25
5.	Materiál a metodika.....	26
5.1.	Sledované soubory.....	26
5.2.	Molekulárně genetická analýza.....	27
5.2.1.	Izolace DNA.....	27
5.2.1.1.	Izolace z plné krve.....	29
5.2.1.2.	Izolace z ředěné krve.....	29
5.2.1.3.	Zjišťování koncentrace a kvality DNA.....	30
5.2.1.4.	Přečišťování.....	30
5.2.2.	Genotypizace pomocí PCR-RFLP.....	31
5.2.2.1.	PCR.....	31
5.2.2.2.	Restrikční štěpení.....	33
5.2.2.3.	Elektroforetická separace.....	34
5.2.3.	Genotypizace pomocí real-time PCR.....	37
5.3.	Přístroje.....	38
5.4.	Statistické zpracování.....	39
6.	Výsledky.....	40
6.1.	Frekvence alel a genotypů analyzovaných polymorfismů.....	40
6.1.1.	<i>THADA</i> (rs10203174).....	40
6.1.2.	<i>MAEA</i> (rs6819243).....	42
6.1.3.	<i>JAZF1</i> (rs849135).....	43
6.1.4.	<i>ARAPI</i> (rs1552224).....	44
6.2.	Genetické skóre.....	45
6.2.1.	Celkové genetické skóre.....	48
6.3.	Asociace genotypů s komplikacemi a způsobem léčby diabetu.....	50
6.3.1.	Syndrom diabetické nohy.....	50

6.3.2.	Nefropatie	52
6.3.3.	Neuropatie.....	54
6.3.4.	Retinopatie	56
6.3.5.	Způsob léčby diabetu	58
7.	Diskuze	60
8.	Závěr	65
9.	Seznam použité literatury	67
9.1.	Internetové zdroje.....	75
10.	Přílohy.....	76

1. Úvod

Diabetes mellitus je skupina metabolických onemocnění, jejichž společným jmenovatelem je chronická hyperglykémie. Především diabetes mellitus 2. typu (T2DM) se stává celosvětově jedním z nejpálčivějších problémů současného zdravotnictví, více než 10 % prostředků vynakládaných na lékařskou péči, je určeno právě na léčbu T2DM. Jeho prevalence neustále narůstá a počátek manifestace se posouvá do stále nižšího věku, pacienti s T2DM ve školním věku dnes nejsou výjimkou. Ačkoli je pravděpodobnost jeho manifestace spojována především s environmentálními faktory, i genetické předpoklady hrají významnou roli a jejich poznání nám může pomoci jak v rámci prevence diabetu, tak prevence přidružených komplikací.

Tato diplomová práce vznikla jako součást projektu zaměřeného na replikaci nálezu Talmud et al., 2014. Původní studie, prováděná na britské populaci, určuje hodnotu odds ratio (OR) pro 65 polymorfismů běžně spojovaných s T2DM a kombinuje jejich rizikovost do rizikového skóre. Z těchto SNPs byly ty nejvýznamnější vybrány pro replikaci na české populaci. Konkrétní polymorfismy byly zvoleny na základě hodnoty OR a četnosti rizikové alely, pro kterou jsme zvolili hranici minimální hodnoty 15 %. Pro analýzu v rámci této diplomové práce byly vybrány polymorfismy rs10203174 v genu *THADA*, rs6819243 v genu *MAEA*, rs849135 v genu *JAZF1* a rs1552224 v genu *ARAP1*.

2. Diabetes mellitus

Jak již bylo zmíněno, diabetes je onemocnění, jehož základním příznakem je zvýšená hladina glukózy v krvi. Glukóza se dostává do krve z gastrointestinálního traktu, ke zvýšení glykémie dochází zhruba 30 minut po jídle. Hladina glukózy v krvi je regulována dvěma antagonisticky působícími hormony, inzulínem a glukagonem, produkovanými v Langerhansových ostrůvkách slinivky břišní. Glukagon je vytvářen alfa buňkami. Je zodpovědný za glykogenolýzu, proces probíhající v játrech, během kterého dochází k přeměně zásobního glykogenu na glukózu. Jeho produkce proto stoupá při hypoglykémii.

Inzulín produkují beta buňky a jeho hladina se naopak zvyšuje při hyperglykémii. Ovlivňuje syntézu proteinů a karbohydrátů, lipogenezi nebo buněčnou diferenciaci, ale především tento hormon zajišťuje ukládání glukózy v játrech ve formě glykogenu a přísun glukózy do buněk většiny tkání. Výjimkou jsou jen buňky centrální nervové soustavy a erytrocyty, které jsou na glukóze přímo závislé a přijímají ji pomocí transportérů na inzulínu nezávislých. Buňky svaloviny a tukové tkáně mají na svém povrchu receptory pro inzulín. Jeho navázání vede ke zvýšení dostupnosti glukózových transportérů na buněčné membráně, čímž dojde k zintenzivnění vstupu glukózy do cytoplasmy buněk (Saltiel et al., 2001; Bouwens and Rooman, 2005).

2.1. Diabetes mellitus 2. typu

2.1.1. Patofyziologie

Základními patofyziologickými rysy T2DM jsou inzulínová rezistence a dysfunkce pankreatických beta buněk vedoucí k poruchám sekrece inzulínu. Klíčovým problémem je však zejména inzulínová rezistence. V důsledku snížení inzulínové senzitivity, projevující se především ve svalové a tukové tkáni, nejsou buňky schopné interakce s inzulínem. Bez něj ale do těchto buněk není možný vstup glukózy, v důsledku čehož zůstává ve zvýšené koncentraci v krvi. V počátečním stádiu nemoci je slinivka obvykle schopná kompenzovat tento problém navýšením sekrece inzulínu. Nadměrná aktivita beta buněk však v konečném důsledku vede ke zhoršení jejich funkčnosti (Östenson, 2001; Saltiel et al., 2001).

Biochemická a molekulární podstata inzulínové rezistence je velmi komplexní záležitostí. U pacientů s T2DM byly nalezeny abnormality v procesu inzulínové

signalizační kaskády, jako například snížená koncentrace a funkčnost inzulinových receptorů či problémy s translokací glukózových transportérů na vnější stranu buněčné membrány (Östenson, 2001; Saltiel et al., 2001).

2.1.2. Diagnostika

Doporučení pro diagnostiku diabetu podle Světové zdravotnické organizace (WHO) obsahují kritéria pro hodnoty glykémie nalačno a pro orální glukózový toleranční test (oGGT), při kterém se měří glykémie 2 hodiny po vypití roztoku obsahujícím 75 g glukózy.

WHO uvádí hodnoty pro diagnostiku nejen diabetu ale i prediabetu. Prediabetes je stav, kdy má pacient mírně zvýšenou glykémii. Může se jednat o poruchu glukózové tolerance (IGT) nebo zvýšenou glykémii nalačno (IFG). Lidé s prediabetem mají zvýšení riziko rozvoje T2DM, ale změna životního stylu může pomoci projevu onemocnění zabránit (World Health Organization, 2006). Diagnostická kritéria doporučená Světovou zdravotnickou organizací naleznete v tabulce 1.

Tabulka 1. Kritéria WHO pro diagnostiku diabetu a prediabetu

	glykémie nalačno	oGGT
diabetes	$\geq 7,0$ mmol/l (126 mg/dl)	$> 11,1$ mmol/l (200 mg/dl)
IGT	$< 7,0$ mmol/l (126 mg/dl)	7,8 – 11,1 mmol/l (140 mg/dl – 200 mg/dl)
IFG	6,1 – 6,9 mmol/l (110 mg/dl – 125 mg/dl)	$< 7,8$ mmol/l (140 mg/dl)

2.1.3. Komplikace

Dlouhodobé zvýšení glykémie působí negativním vlivem na srdce, cévy, ledviny, oči i nervovou soustavu. Zdravotní komplikace můžeme rozdělit na mikrovaskulární a makrovaskulární.

Mezi mikrovaskulární komplikace patří poškození malých cév vedoucí v obtížím se zrakem, nervovou soustavou a ledvinami. Často dochází k nefropatii, projevující se albuminurií a selháním funkce ledvin. Dále pak k retinopatii, poškozování sítnice, vedoucí postupně až k úplné slepotě. Mezi tyto komplikace řadíme i tzv. diabetickou nohu, což je

označení pro destruktivní poškození tkání nohy způsobené poškozením cév a periferních nervů (Fowler, 2008).

Makrovaskulární komplikace označují kardiovaskulární onemocnění ovlivňující především velké cévy a srdce. Klíčovým procesem pro vznik těchto obtíží je ateroskleróza vedoucí k zužování cév. Pacienti s T2DM pak mají zvýšené riziko srdečního selhání, infarktu a dalších problémů s kardiovaskulárním systémem (Fowler, 2008).

2.1.4. Léčba

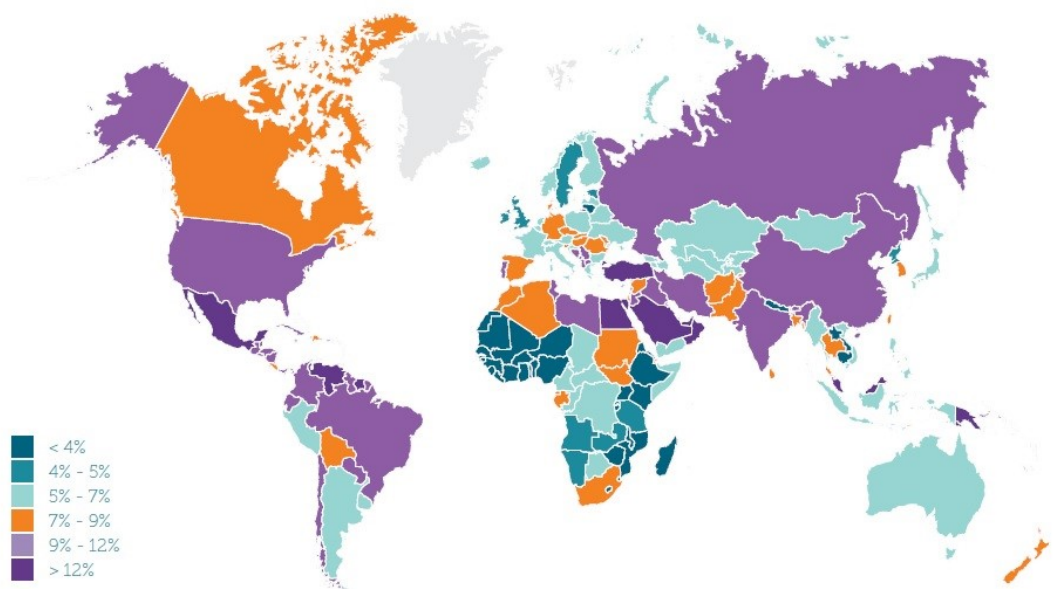
Léčba v případě T2DM je nutná z důvodu zamezení projevu zdravotních komplikací způsobovaných chronickým zvýšením hladiny glukózy v krvi, mezi které patří především kardiovaskulární obtíže. Jako prvotní, základní krok léčby, který následuje přímo po diagnostikování T2DM, je obecně změna životního stylu. Teprve pokud dieta nestačí k dostatečnému snížení glykémie, přichází na řadu farmakoterapie. V současné době je celosvětový trend všem pacientům jako první lék předepsat metformin. Ten pomáhá snižovat glykémii pomocí omezování glukoneogeneze v játrech a zlepšováním inzulinové senzitivity. Jeho aplikace také koreluje s redukcí inzulinové rezistence. Metformin interferuje s komplexem I dýchacího řetězce v mitochondriích pomocí zvyšování poměru AMP a ATP, důsledkem čehož dochází k aktivaci AMP kinázy. Činnost této kinázy pak omezuje proces glukoneogeneze. Teprve pokud nejsou účinky metforminu dostatečně efektivní, dochází k aplikaci i jiných léků (Singh et al., 2016). Přehled skupin běžně používaných léků a mechanismu jejich účinku naleznete v tabulce 2.

Tabulka 2. Přehled léků používaných k léčbě T2DM. Převzato a upraveno podle Singh et al., 2016.

třída	léky	mechanismus účinku
biguanidy	Metformin	Aktivace AMP-kinázy
deriváty sulfonylurey	Glipizid, glimepirid, glyburid, gliclazid	Inhibice KATP kanálu na plasmatické membráně beta buněk
thiazolidindiony	Pioglitazon, rosiglitazon	Aktivace PPAR- γ
meglitinidy	Nateglinid, repaglinid	Inhibice KATP kanálu na plasmatické membráně beta buněk
inhibitory DPP-4	Alogliptin, linagliptin, saxagliptin, sitagliptin, vildagliptin	Inhibice DPP-4, ovlivnění dráhy receptoru GLP-1
inhibitory α -glucosidázy	Akarbóza, voglibóza	Inhibice intestinální α -glucosidázy
inhibitory SGLT-2	Canagliflozin, dapagliflozin, empagliflozin	Inhibice SGLT2 transporterů v ledvinách
agonisté GLP-1	Exenatid, liraglutid	Aktivace receptoru GLP-1

2.1.5. Epidemiologie

Podle International Diabetes Federation trpělo v roce 2015 celosvětově diabetem více než 400 milionů dospělých a do roku 2040 by toto číslo mohlo stoupnout až na téměř

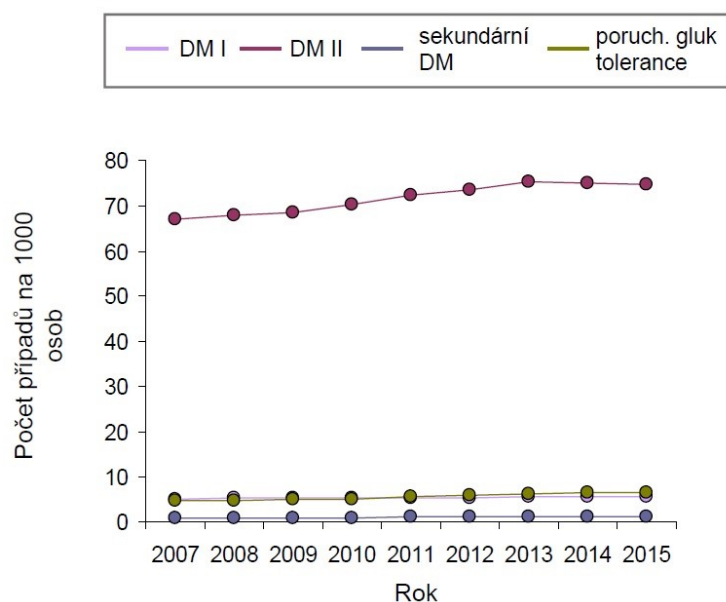


Obrázek 1. Prevalence diabetu ve světových populacích, převzato a upraveno podle International Diabetes Federation, 2015.

650 milionů. Tuto diagnózu by tak měl každý desátý člověk. Nejvyšší nárůst prevalence bude v dnes chudších zemích, jejichž ekonomická síla se zvýší. Na léčbu diabetu je v dnešní době celosvětově vynakládáno 12 % ze všech prostředků určených na lékařskou péči (International Diabetes Federation, 2015). Tato data sice představují údaje o všech typech diabetu, ale počet pacientů s T2DM dosahuje cca 90 % ze všech diabetiků (Holman et al., 2015).

Nárůst prevalence T2DM je spojen se změnou životního stylu, což začíná být v současné době problém především v hospodářsky se rozvíjejících zemích, ve kterých si většinové obyvatelstvo ekonomicky polepšuje poměrně rychlým tempem. Toto náhlé zvýšení životní úrovně vede jednoznačně k méně zdravému životnímu stylu. Problém je také v nerozvinutých zdravotnických systémech, které nejsou připravené pro dostatečný záchyt nemoci. Podle odhadů polovina dospělých osob trpící diabetem není diagnostikována (International Diabetes Federation, 2015).

Mimo trend nárůstu prevalence diabetu nestojí ani Česká republika. Mezi lety 2007 a 2015 stoupl počet diagnostikovaných pacientů s T2DM o téměř 14 %, na celkový počet 787 tisíc. Tato hodnota odpovídá 7,5 % z celkové populace a 85 % ze všech diagnostikovaných diabetiků. Ačkoli prevalence od roku 2013 mírně poklesla, incidence narůstá neustále. V roce 2015 bylo nově diagnostikováno přes 80 tisíc diabetiků (URL1: ÚZIS ČR). Vývoj prevalence diabetu v České republice je prezentován v grafu 1.



Graf 1. Vývoj prevalence diabetu v České republice, převzato a upraveno podle URL1: ÚZIS ČR.

2.2. Další typy diabetu

2.2.1. Diabetes mellitus 1. typu

Diabetes mellitus 1. typu je způsoben autoimunitní reakcí, při které T-lymfocyty rozeznají antigeny pankreatických beta buněk jako cizorodé, a dochází tak k jejich degradaci. Na základě jejich absence pak tělo není schopno samo syntetizovat dostatečné množství inzulínu (Seino et al., 2010). Tento typ diabetu je nejčastěji diagnostikován v dětství. Typickými příznaky jsou neustálý pocit žízně a hladu, časté močení, únava, rozostřené vidění a náhlý úbytek váhy (International Diabetes Federation, 2015). Vzhledem k nedostatku vlastního inzulínu je nutnou léčbou T1DM podávání tohoto hormonu. Inzulín se aplikuje injekčně inzulínovým perem nebo pomocí automatické inzulínové pumpy.

T1DM je multifaktoriálně dědičné onemocnění. Mezi environmentální rizikové faktory patří především infekce a nutriční faktory. Je prokázáno, že rozvoj této nemoci může být zapříčiněn virovou nákazou (Das et al., 2016), avšak časné setkávání se s patogeny působí naopak projektivně (Abela et al., 2013). Přehnaná hygiena je tak pravděpodobně příčina toho, proč má i autoimunitní diabetes vyšší prevalenci v rozvinutých státech, ačkoli je hlavním rizikovým faktorem genotyp jedince. Rozvoj nemoci dále ovlivňuje složení stravy, především v prvních měsících života dítěte. Protektivně působí především kojení mateřským mlékem (Pereira et al., 2014) a vitamin D (Adamczak et al., 2014).

Z genetického pozadí jedince hraje nejdůležitější roli v míře rizika komplex *HLA* genů nacházející se na krátkém raménku 6. chromozomu, a to zejména *HLA* geny II. třídy, které dokáží vysvětlit až 50 % rizika (Ounissi-Benkalha et al., 2008). Mezi další geny spojené s T1DM patří gen kódující inzulín (*INS*) a geny ovlivňující T-lymfocyty, především *CTLA-4* (Chen et al., 2013), *PTPN22* (Gloria-Bottini et al., 2014) a *IL2RA* (Vella et al., 2005). V genu *INS* bylo nalezeno více polymorfismů spojených s T1DM, ale nejvyšší riziko přináší počet tandemových repetitivních sekvencí v promotorové oblasti genu (Portuesi et al., 2013).

2.2.2. Gestační diabetes mellitus

Jako gestační diabetes mellitus (GDM) se označuje diabetes, který je diagnostikován dříve zdravé ženě během druhého nebo třetího trimestru gravidity (American Diabetes Association, 2015). K poruše metabolismu glukózy dochází v přímé

souvislosti s těhotenstvím (Seino et al., 2010) a po porodu obvykle samovolně odezní. Zvýšení hladiny cukru v krvi během gravidity však ovlivňuje negativně jak matku, tak i plod (Seino et al., 2010). Způsobuje makrosomii plodu, ale především zvyšuje riziko vývojových vad, předčasného porodu, císařského řezu, hyperbilirubinémie či preeklapsie (The HAPO Study Cooperative Research Group, 2008). Ženy, které během těhotenství měly GDM, mají větší riziko pozdější manifestace T2DM (Bellamy et al., 2009).

2.2.3. Méně časté typy diabetu

Mezi méně časté formy diabetu patří monogenně dědičná forma onemocnění označovaná jako MODY. Tento typ diabetu má 1–2 % pacientů. Existuje několik typů, rozlišovaných dle genu, ve kterém se konkrétní mutace nachází. Ve všech případech se však jedná o autozomálně dominantní dědičnost. MODY je diagnostikován téměř vždy během dětství na základě genetického vyšetření (Meissner et al., 2010).

Dalším méně obvyklým typem diabetu je LADA, která stojí na pomezí T1DM a T2DM. Jedná se o autoimunitní formu onemocnění, při kterém dochází k destrukci pankreatických beta buněk, jež se však neprojeví v dětství jako T1DM, ale až v dospělosti. S T2DM ho spojuje nejen věk manifestace, ale i nezávislost pacientů na injekční aplikaci inzulínu, především během prvních měsíců po počátku projevu choroby (Basile et al., 2014).

2.3. Predispoziční faktory pro T2DM

2.3.1. Environmentální faktory

Až 70 % rizika výskytu T2DM je způsobeno negenetickými faktory (Hara et al., 2014a). Některé z nich ovlivnit nemůžeme, nebo jen těžko. Např. stěhování se z velkých měst je možnost reálná v řádech jednotlivců, nikoli jako plošné řešení celosvětového problému. Obtížně ovlivnitelné jsou i podmínky působící na plod během intrauterinního vývoje. Jednak člověk v dospělosti už zpětně tyto faktory nijak ovlivnit nemůže, jednak matky ne vždy mají přístup k dostatku kvalitní stravy. Typickým příkladem je malnutricí zvýšené riziko T2DM u osob narozených během války (Ravelli et al., 1998). Významná část faktorů asociovaných s diabetem však souvisí se současným životním stylem jedince.

2.3.1.1. Intrauterinní vývoj

Na riziko projevu T2DM mají vliv nejen životní podmínky jedince v dospělosti ale i faktory, které na něho působily během intrauterinního vývoje. Studie porovnávající rozdíly mezi sourozenci, jejichž matky trpěly T2DM, ukazuje, že intrauterinní vystavení hyperglykémii zvyšuje riziko diabetu. Děti, které se narodili ještě před projevem T2DM u jejich matky, mají menší pravděpodobnost manifestace onemocnění než jejich sourozenci, kteří se narodili až po zvýšení matčiny glykémie (Dabelea et al., 2000). Negativní vliv na rozvoj diabetu má i intrauterinní malnutrice, a to především v pozdní fázi gestace. Narušuje metabolismus glukózy a inzulínu, což vede ke zvýšení rizika glukózové intolerance v dospělosti (Ravelli et al., 1998).

Prokázána je i souvislost diabetu s porodní hmotností. Studie prováděná na monozygotních a dizygotních dvojčatech ukázala, že sourozenci s manifestujícím se T2DM měli nižší porodní hmotnost než jejich zdraví sourozenci (Poulsen et al., 1997). Jiná studie prokazuje protektivitu normální porodní hmotnosti, tj. 2500–4000 g. Nižší hmotnost zvyšovala riziko o téměř 50 %, s vyšší hmotností se riziko zvýšilo o přibližně 40 % (Harder et al., 2007).

2.3.1.2. Životní styl

Zvýšení pravděpodobnosti manifestace diabetu koreluje s kouřením, obezitou i ekonomickým statusem. Bývalí kuřáci mají o 50 % větší riziko T2DM než lidé, kteří nikdy nekouřili. Rizikovým faktorem je i pasivní kouření, které pravděpodobnost

projevu onemocnění dokáže zvýšit o třetinu (Wei et al., 2015). BMI nad 30 zvyšuje riziko dokonce o téměř 80 %, podobnou rizikovost přináší i nízký ekonomický status (Tentolouris et al., 2012). Dalším silným faktorem je nedostatek pohybu. Studie ukazují, že u osob se zvýšeným rizikem T2DM výrazná změna životního stylu spojená s vyšší fyzickou aktivitou přináší více než dvojnásobné snížení tělesné hmotnosti i glykémie nalačno oproti změně s menším důrazem na nárůst pohybu (Kulzer et al., 2014). Dále je rizikovým faktorem i nedostatek kvalitního spánku (Lee et al., 2016) a špatný psychický stav. Např. posttraumatická stresová porucha dokáže zvýšit riziko vzniku T2DM až na dvojnásobek (Roberts et al., 2015).

Za prevenci T2DM stejně jako jeho komplikací nebo jiných civilizačních onemocnění je považována tzv. „zdravá strava“. Výzkumů, které určují přesnou míru rizikovosti konkrétních potravin nebo jejich složek, je nespočet. Tyto studie na základě svých výsledků určují doporučení ohledně konzumovaného množství pro jednotlivé potraviny. Základem „zdravé stravy“ je však rozumně vyvážený jídelníček.

Obecné doporučení pro složení stravy je podobné jak pro prevenci diabetu, tak pro prevenci jeho komplikací. Celkově by příjem tuků neměl přesahovat 30 % denního příjmu energie, pro nasycené a trans nenasycené mastné kyseliny je horní hranice 10 %. Sacharidy by měly přinášet mezi 45 % a 60 % celkového příjmu energie, monosacharidy a disacharidy ne více než 10 %. Energetický příjem z bílkovin je optimálně 10 % – 20 % z celkového příjmu (Mann et al., 2004).

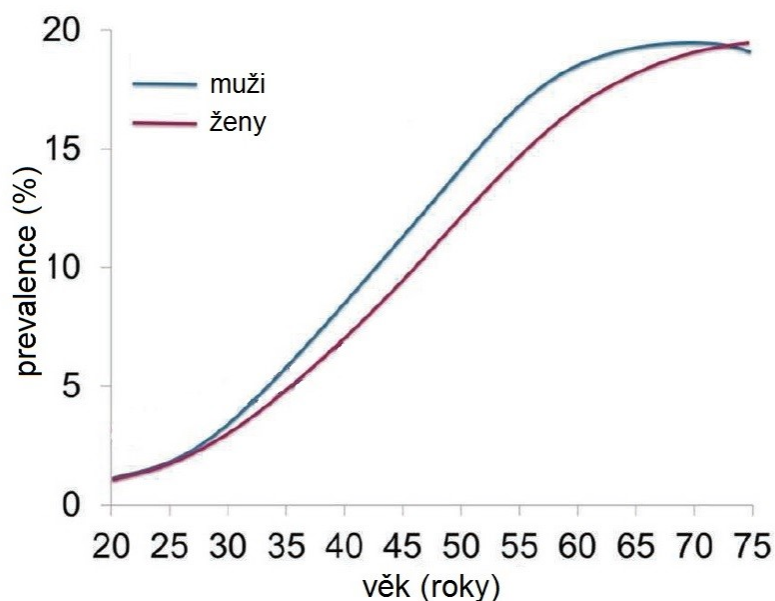
Velmi protektivní složkou potravy je vláknina, její doporučené minimální množství ve stravě je 25 g denně. Zvýšení příjmu vlákniny o 2 g za den dokáže snížit riziko T2DM o 6 % (Yao et al., 2014). Optimálně by lidé měli každý den zkonsumovat alespoň 200 g ovoce a stejné množství zeleniny, především druhů bohatých na vlákninu (Piepoli et al., 2016), luštěniny jíst minimálně čtyřikrát týdně (Mann et al., 2004), ryby 1 – 2x za týden (Piepoli et al., 2016).

Naopak negativní vliv nejen na T2DM má nadměrné množství soli v potravě, a to především kvůli zvyšování krevního tlaku (Mann et al., 2004). Její denní příjem by neměl přesáhnout 5 g. Doporučována není ani přílišná konzumace alkoholu, pro muže je stanoven horní limit příjmu 20 g za den, pro ženy polovinu. Problém s alkoholickým nápoji však bývá převážně v jejich energetické hodnotě. Vhodnost vyhýbání se i nealkoholickým slazeným nápojům je samozřejmostí (Piepoli et al., 2016). Ačkoli přesný mechanismus účinku není znám, rizikově působí i nedostatek vitamínu D (Acharya et Halemani, 2016).

2.3.1.3. Neovlivnitelné faktory

Mezi faktory, které ovlivnit nemůžeme, patří především věk a pohlaví. Lidé nad šedesát let mají padesátinásobné riziko oproti mladším čtyřiceti let (Tentolouris et al., 2012). Muži mají až 2x větší pravděpodobnost T2DM než ženy (Gourdy et al., 2001; Wändell et Carlsson, 2014), jsou diagnostikováni o několik let dříve a s nižším BMI (Wändell et Carlsson, 2014).

Riziko projevu onemocnění dále ovlivňují i látky vyskytující se v prostředí. Souvislost s poškozováním beta buněk byla prokázána pro mnoho chemických agens (Fabricio et al., 2016). Příkladem chemikálie zvyšující riziko T2DM je DDE (dichlordifenyldichlorethylen), produkt vznikající při rozkladu DDT (dichlordifenyiltrichlorethan), dříve běžně používaného pesticidu (Fakhri et al., 2016). Rizikovým faktorem je i velká doprava, hluk a znečištění ovzduší (Dzhambov et Dimitrova, 2016).



Graf 2. Prevalence T2DM podle pohlaví, převzato a upraveno podle Kautzky-Willer et al., 2016.

2.3.2. Genetické faktory

Ačkoli na T2DM mají vliv především negenetické faktory, i genetické pozadí jedince hraje v pravděpodobnosti projevu nemoci významnou roli. Riziko manifestace onemocnění se zvyšuje o více než 30 %, pokud jím trpí jeden z rodičů, a o 60 %, pokud mají diabetes oba rodiče (Meigs et al., 2000). Síla vlivu vnějších faktorů byla analyzována na dvojčatech. U monozygotních dvojčat byla konkordance 70 %, u dizygotních 30–40 % (Lyssenko et Laakso, 2015).

V současné době známe více než 70 lokusů asociovaných s T2DM, z nichž většina má jen slabý vliv (Grarup et al., 2014). Všechny nám známé polymorfismy dohromady nedokáží vysvětlit více než 10 % dědičnosti (Hara et al., 2014a). Tento problém, nazývaný missing heritability, vyzívá k hledání dalších lokusů zodpovědných za rozvoj onemocnění. Ozývají se ale i názory, že genetická složka dědičnosti T2DM může být nadhodnocována, a že k plnému vysvětlení genetického pozadí nemoci už možná mnoho nezbývá (Zug et al., 2011).

Genetika T2DM je velmi komplexní záležitostí, spousta genů je ve vazbě, další lokusy mohou působit rizikově i nepřímo, např. vlivem na tělesnou hmotnost či krevní tlak. Geny, u nichž byla prokázána přímá asociace s diabetem, lze rozdělit do skupin podle jejich účinku. Mezi faktory, kterými ovlivňují riziko T2DM patří:

- hyperglykémie
- inzulinová rezistence
- defekty v metabolismu inzulinu
- defekty funkce beta buněk
- neznámé nebo jiné faktory

Největší skupinu tvoří geny, u nichž neznáme jejich přesnou funkci, případně biologickou souvislost s diabetem (Dimas et al., 2014).

Mezi nejrizikovější polymorfismy patří rs7903146 nacházející se v intronu genu *TCF7L2*, který kóduje transkripční faktor 7 like 2. Jeho OR se dle různých studií pohybuje mezi hodnotami 1,3 a 1,5 (Tong et al., 2009; Hara et al., 2014b). Riziková alela SNP rs2237892, který se nachází v intronu genu *KCNQ1* kódujícího α podjednotku napěťově řízeného K⁺ kanálu, zvyšuje riziko T2DM až o 40 % (Yasuda et al., 2008). Výrazný vliv na onemocnění mají i geny, jejichž produkty ovlivňují cyklin dependentní kinázy. Nejvyšší

riziko přináší rs10811661 nacházející se v intergenové oblasti mezi geny *CDKN2A* a *CDKN2B*, které kódují inhibitory cyklin dependentních kináz. OR tohoto polymorfismu je 1,2 (Saxena et al., 2007). Přehled nejsilněji asociovaných SNP naleznete v tabulce 3.

2.3.2.1. Vyšetřované geny

Jak již bylo popsáno výše, pro zjišťování asociace s T2DM byly pro tuto diplomovou práci vybrány 4 polymorfismy na základě výsledků získaných na britské populaci. Geny *THADA* (rs10203174), *MAEA* (rs6819243), *JAZF1* (rs849135) a *ARAP1* (rs1552224) byly zvoleny pro jejich rizikovost a dostatečnou četnost rizikové alely.

***THADA* (rs10203174)**

Gen *THADA* (thyroid associated protein, OMIM kód 611800) je lokalizován na druhém chromozomu na pozici 2p21. Velikost tohoto genu je 365 kb, ORF má délku 5862 bp. *THADA* kóduje protein asociovaný s adenomem štítné žlázy. U člověka nebyl dosud popsán žádný homologní protein a byla nalezena pouze jedna konzervativní doména. Přesná funkce genu není zatím známa, ale pravděpodobně se uplatňuje v dráze spojené s apoptózou (Drieschner et al., 2007). Jeho exprese byla zaznamenána ve slinivce, nadledvinách, štítné žláze, varlatech, brzlíku, tenkém střevě a žaludku. Bylo také pozorováno, že u benigních tumorů štítné žlázy dochází v regionu obsahujícím gen *THADA* k chromozomovým aberacím (Goodarzi et al., 2011).

Vyšetřovaný polymorfismus rs10203174 se nachází v intronu tohoto genu a s T2DM je asociován v evropské i asijské populaci (Talmud et al., 2014; Zia et al., 2015). Protektivní alela T je ancestrální, riziková alela C má v bělošské populaci zastoupení s frekvencí cca 90 % a zvyšuje riziko T2DM o 10 % (Talmud et al., 2014).

***MAEA* (rs6819243)**

Gen *MAEA* (macrophage erythroblast attacher, OMIM kód 606801) je lokalizován na čtvrtém chromozomu na pozici 4p16. Produkt tohoto genu se skládá z 395 aminokyselin a obsahuje malou N-terminální doménu, jednoduchou transmembránovou doménu a velkou cytoplasmatickou doménu, která zahrnuje několik tyrosinových zbytků. Celý protein má velikost 43 kD. Přes extracelulární N terminální doménu je schopen vázat erytroblasty. U těchto maturujících buněk působí mezibuněčný kontakt zprostředkovaný proteinem MAEA proti apoptóze (Hanspal et al., 1998).

Vyšetřovaný polymorfismus rs6819243 se nachází v intronu tohoto genu. Protektivní alela tohoto SNP je C. Ancestrální, riziková alela T má v bělošské populaci zastoupení s frekvencí přes 90 % a riziko T2DM zvyšuje o více než 30 % (Talmud et al., 2014).

***JAZF1* (rs849135)**

Gen *JAZF1* (Juxtaposed with another zinc finger gene 1, OMIM kód 606246) je lokalizován na sedmém chromozomu na pozici 7p15. Protein JAZF1 je exprimován v téměř všech tkáních lidského těla, avšak ve slinivce, mozku a játrech byla zaznamenána jen nízká míra exprese. Zvýšená exprese genu snižuje diferenciaci myogenních buněk i tvorbu myotubulů, ale také je pozitivně korelována s proliferací myoblastů. *JAZF1* je, společně s *JJAI*, spojován především s endometriálními stromálními sarkomy (Koontz et al., 2001).

Biologické spojení genu *JAZF1* s T2DM je stále nejasné, ale mohlo by souviset s genem *AMPD1* (adenosine monophosphate deaminase 1) a fosforylací AMPK (adenosine 5' monophosphate activated protein kinase). Aktivace této kinázy stimuluje příjem glukózy do svalových buněk pomocí translokace přenašečů GLUT4 na vnější stranu cytoplasmatické membrány. Defosforylace AMPK tak může kvůli narušení příjmu glukózy do buněk vést k hyperglykémii (Yuasa et al., 2015).

Vyšetřovaný polymorfismus rs849135 se nachází v intronu tohoto genu. Protektivní alela tohoto SNP je A. Ancestrální, riziková alela G má v bělošské populaci zastoupení s frekvencí přes 50 % a riziko T2DM zvyšuje o téměř 15 % (Talmud et al., 2014).

***ARAP1* (rs1552224)**

Gen *ARAP1* (Arf-GAP, Rho-GAP, ankyrin repeat and pleckstrin homology domains-containing protein 1, OMIM kód 606646) je lokalizován na jedenáctém chromozomu na pozici 11q13. Další používaný název pro tento gen je *CENTD2* (Centaurin delta-2). Protein ARAP1 je složen z 1210 aminokyselin a ovlivňuje mezibuněčnou signalizaci a komunikaci. Aktivita Arf-GAP domény ovlivňuje změny v Golgiho aparátu. Tato doména i Rho-GAP se podílí na inhibici buněčného dělení (Miura et al., 2002).

Vyšetřovaný polymorfismus rs1552224 se nachází v intronu genu *ARAP1*. Asociace tohoto SNP s T2DM byla prokázána v evropské i asijské populaci (Talmud et al., 2014; Qian et al., 2015; Zia et al., 2015). Protektivní alela je G. Ancestrální alela T je riziková,

v bělošské populaci má zastoupení s frekvencí přes 80 % a riziko T2DM zvyšuje o téměř 15 % (Talmud et al., 2014).

2.3.3. Epigenetické faktory

Epigenetické faktory stojí na pomezí faktorů genetických a environmentálních. Jedná se modifikace vlákna DNA často spojené se změnou exprese genů, které jsou vyvolané vnějšími podněty. Epigenetické modifikace jsou tkáňově specifické a mohou se měnit také v průběhu života. Výzkumy jejich vlivu na T2DM jsou teprve v počátcích, ale ukazuje se, že by mohly být klíčem k vysvětlení dosud nejasných příčin nemoci a interakcí různých rizikových faktorů.

V Langerhansových ostrůvkách bylo u T2DM pacientů nalezeno 1649 CpG ostrůvků a 853 genů s rozdílnou metylací oproti zdravým kontrolám (Dayeh et al., 2014). Konkrétně byla u pacientů nalezena například hypermethylace promotoru genu *PPARGC1A*, který kóduje koaktivátor jaderných receptorů, a dalších transkripčních faktorů, snižující expresi genu o 90 % a sekreci inzulínu o 41 % (Ling et al., 2008). Obezitou způsobená hypermethylace v promotoru genu *ADIPOQ*, který kóduje adiponektin, snižuje jeho expresi, na základě čehož dochází k rozvoji glukózové intolerance a inzulínové rezistence (Kim et al., 2015). Změnou metylace dokáže v Langerhansových ostrůvkách snížit expresi genů a syntézu inzulínu pravděpodobně i palmitát (Hall et al., 2014). Zajímavostí také je, že struktura epigenetických modifikací se mění během různých stádií nemoci (Travers et al., 2013).

V epigenetických modifikacích je však zakódován nejen současný životní styl, ale i vlivy, které na jedince působily během jeho intrauterinního vývoje. Tímto faktem můžeme vysvětlit ovlivnění rizik metabolických poruch u dětí na základě výživy jejich matek. Hodnota BMI matky ovlivňuje u jejích potomků metylaci několika genů spojených s obezitou (Oelsner et al., 2017). Přes epigenetiku lze také vysvětlit souvislost porodní hmotnosti s rizikem T2DM a dalších metabolických poruch. Vliv porodní hmotnosti na epigenetické modifikace byl u dospělých jedinců prokázán i na kmenových buňkách původem z tukové tkáně (Broholm et al., 2016).

Tabulka 3. Přehled polymorfismů asociovaných s T2DM, převzato a upraveno podle Talmud et al, 2014. Barevně jsou vyznačeny námi analyzované polymorfismy.

SNP	chromozom	gen	riziková/ protektivní alela	frekvence rizikové alely	OR
rs17791513	9	<i>TLE4</i>	A/G	0,91	1,43
rs7903146	10	<i>TCF7L2</i>	T/C	0,27	1,32
rs6819243	4	<i>MAEA</i>	T/C	0,96	1,32
rs3734621	6	<i>KCNK16</i>	C/A	0,03	1,27
rs7756992	6	<i>CDKAL1</i>	G/A	0,29	1,19
rs10811661	9	<i>CDKN2A/B</i>	T/C	0,82	1,18
rs4402960	3	<i>IGF2BP2</i>	T/G	0,33	1,18
rs9936385	16	<i>FTO</i>	C/T	0,41	1,18
rs5215	11	<i>KCNJ11</i>	C/T	0,41	1,16
rs849135	7	<i>JAZF1</i>	G/A	0,52	1,14
rs1552224	11	<i>ARAP1 (CENTD2)</i>	A/C	0,81	1,14
rs2943640	2	<i>IRS1</i>	C/A	0,63	1,14
rs10923931	1	<i>NOTCH2</i>	T/G	0,12	1,13
rs10842994	12	<i>KLHDC5</i>	C/T	0,80	1,11
rs163184	11	<i>KCNQ1</i>	G/T	0,50	1,11
rs12571751	10	<i>ZMIZ1</i>	A/G	0,52	1,11
rs7845219	8	<i>TP53INP1</i>	T/C	0,52	1,11
rs16927668	9	<i>PTPRD</i>	T/C	0,24	1,11
rs10203174	2	<i>THADA</i>	C/T	0,89	1,10
rs3802177	8	<i>SLC30A8</i>	G/A	0,66	1,09
rs7177055	15	<i>HMG20A</i>	A/G	0,68	1,09
rs4812829	20	<i>HNF4A</i>	A/G	0,19	1,09
rs12427353	12	<i>HNF1A (TCF1)</i>	G/C	0,79	1,08
rs1359790	13	<i>SPRY2</i>	G/A	0,72	1,08
rs12970134	18	<i>MC4R</i>	A/G	0,27	1,08
rs2796441	9	<i>TLE1</i>	G/A	0,57	1,08
rs11634397	15	<i>ZFAND6</i>	G/A	0,64	1,08
rs8182584	19	<i>PEPD</i>	T/G	0,38	1,08
rs11717195	3	<i>ADCY5</i>	T/C	0,77	1,07
rs4458523	4	<i>WFS1</i>	G/T	0,57	1,07
rs10830963	11	<i>MTNR1B</i>	G/C	0,31	1,07
rs2075423	1	<i>PROX1</i>	G/T	0,62	1,07
rs13389219	2	<i>GRB14</i>	C/T	0,60	1,07
rs780094	2	<i>GCKR</i>	C/T	0,61	1,07
rs2334499	11	<i>DUSP8</i>	T/C	0,43	1,07
rs2007084	15	<i>AP3S2</i>	G/A	0,92	1,07
rs4502156	15	<i>C2CD4A</i>	T/C	0,52	1,06
rs7569522	2	<i>RBMS1</i>	A/G	0,44	1,06
rs1801282	3	<i>PPARG</i>	C/G	0,86	1,05
rs10401969	19	<i>CILP2</i>	C/T	0,08	1,05
rs11257655	10	<i>CDC123/CAMK1D</i>	T/C	0,23	1,05

3. Cíle práce

1. Stanovit genotypy českých pacientů s T2DM a zdravých kontrol u polymorfismů rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224.
2. Zjistit hodnotu OR pro jednotlivé rizikové genotypy.
3. Vypočítat genetické skóre pro kombinace genotypů v námi vybraných polymorfismech.
4. Zjistit, zda varianty rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224 kromě potenciálního ovlivnění rizika vzniku T2DM ovlivní u diabetických pacientů projevy následných zdravotních komplikací.

4. Hypotézy

Na základě studie, která zjistila rizikovost alel polymorfismů rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224 u britské populace, jsme stanovili následující hypotézy:

1. U pacientů s T2DM bude u polymorfismu rs10203174 vyšší výskyt alely C než u zdravých kontrol.
2. U pacientů s T2DM bude u polymorfismu rs6819243 vyšší výskyt alely T než u zdravých kontrol.
3. U pacientů s T2DM bude u polymorfismu rs849135 vyšší výskyt alely G než u zdravých kontrol.
4. U pacientů s T2DM bude u polymorfismu rs1552224 vyšší výskyt alely T než u zdravých kontrol.

5. Materiál a metodika

5.1. Sledované soubory

Tato práce byla zpracovávána v Laboratoři pro výzkum aterosklerózy pražského Institutu klinické a experimentální medicíny.

Skupinu pacientů tvořili dospělí jedinci, kteří se s T2DM léčí v IKEMu. Pro tuto práci jsme genotypizovali 712 vzorků pacientů. Skupina obsahuje 65 % mužů a 35 % žen. Průměrný věk pacientů je 62 let. Izolace DNA byla u diabetiků prováděna z periferní krve.

Kontrolní soubor tvořili jedinci z projektu post-MONICA. Tato studie Světové zdravotnické organizace se zaměřuje na sledování kardiovaskulárních onemocnění. Osoby byly pro účast v této studii vybírány jako náhodný vzorek dospělé české populace v 9 okresech České republiky (Cífková et al., 2010). V rámci této diplomové práce jsme genotypizovali 752 vzorků kontrol. Pro polymorfismus rs10203174 byl vzhledem k nižší úspěšnosti genotypizace počet analyzovaných kontrol navýšen na 1034 vzorků. Kontrolní skupina obsahuje 57 % mužů a 43 % žen. Průměrný věk v tomto souboru je 49 let. Izolace DNA byla u kontrol prováděna z plné periferní krve.

5.2. Molekulárně genetická analýza

5.2.1. Izolace DNA

Chemikálie

destilovaná voda (dH₂O)

1 M Tris-HCl

- 24,23 g Tris (Sigma-Aldrich, USA)
- doplněno do 200 ml dH₂O
- pH upraveno pomocí 1 M HCl na 7,6

1 M KCl

- 7,46 g KCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)
- doplněno do 100 ml dH₂O

1 M MgCl₂

- 20,33 g MgCl₂ (Lach-Ner s.r.o., ČR)
- doplněno do 100 ml dH₂O

0,5 M EDTA

- 37,22 g EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
- doplněno do 200 ml destilovanou vodou
- pH upraveno pomocí 1 M NaOH na 8,2

TKM 1

- 10 ml 1 M Tris-HCl
- 10 ml 1 M KCl
- 10 ml 1 M MgCl₂
- 4 ml 0,5 M EDTA
- doplněno do 1 000 ml dH₂O

IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich, USA)

fyzilogický roztok

- 9 g NaCl (Lach-Ner s.r.o., ČR)
- doplněno do 1 000 ml dH₂O

5% SDS

- 5 g lauryl sulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- doplněno do 100 ml dH₂O

1 M NaCl

- 5,844 NaCl
- doplněno do 100 ml dH₂O

FASANO A

- 10 ml 0,5 M EDTA
- 10 ml 1 M Tris-HCl
- 10 ml 5 M NaCl
- doplněno do 225 ml dH₂O + 25 ml 5% SDS

proteináza K

- >600 U/ml ~ 20 mg/ml (Thermo Fisher Scientific, USA)

nasycený roztok NaCl

izopropanol (PENTA s.r.o., ČR)

70% etanol (PENTA s.r.o., ČR)

100% etanol (PENTA s.r.o., ČR)

TE pufr

- 5 ml 1 M Tris-HCl
- 1 ml 0,5 M EDTA
- doplněno do 500 ml dH₂O

fenol-chloroform-isoamylalkohol

- směs v poměru 25:24:1 (Sigma-Aldrich, USA)

chloroform-isoamylalkohol

- směs v poměru 24:1 (Sigma-Aldrich, USA)

3M octan amonný (Sigma-Aldrich, USA)

glykogen (Sigma-Aldrich, USA)

5.2.1.1. Izolace z plné krve

Účastníkům studie bylo odebráno do zkumavky Vacutainer s antikoagulačním činidlem EDTA 5 ml krve.

Postup

1. Na dno zkumavky jsme napipetovali 50 μ l IGEPALU.
2. Do zkumavky jsme nalili 5 ml plné krve a 5 ml TKM 1.
3. Po důkladném promíchání jsme zkumavku centrifugovali 20 minut při 3500 otáčkách za minutu (rpm) v centrifuze chlazené na 4 °C.
4. Supernatant jsme slili a peletu na dně oplachovali ještě 3x 5 ml TKM 1, tj. vždy důkladně promíchali, centrifugovali 20 minut při 3500 rpm v centrifuze chlazené na 4 °C, supernatant slili a přidali 5 ml TKM 1.
5. Čistou peletu jsme resuspendovali v 0,5 ml fyziologického roztoku, 3 ml FASANA A a 25 μ l PROTEINÁZY K.
6. Krátce jsme promíchali a inkubovali 48 hodin při 37 °C.
7. Připipetovali jsme 1,5 ml přesyceného roztoku NaCl, důkladně zvortexovali a uložili na 30 minut do lednice.
8. Centrifugovali jsme v chlazené centrifuze 20 minut při 3500 rpm.
9. Supernatant jsme slili do čisté zkumavky a přidali 3 ml izopropanolu.
10. Vlákná DNA jsme přenesli do mikrozkušavky s 0,5 ml 70% ethanolu.
11. Mikrozkušavku jsme centrifugovali 2 minuty při 10800 rpm.
12. Supernatant jsme slili a připipetovali 0,5 ml 100% ethanolu.
13. Opět jsme mikrozkušavku centrifugovali 2 minuty při 10800 rpm.
14. Supernatant jsme slili a zbytek alkoholu nechali odpařit.
15. Nakonec jsme přidali 300 μ l TE pufru, ve kterém se DNA rozpustila.

5.2.1.2. Izolace z ředěné krve

Pacientům bylo odebráno do zkumavky Vacutainer s antikoagulačním činidlem EDTA 5 ml krve, která byla naředěna 5 ml vody.

Postup

1. 10 ml naředěné krve jsme centrifugovali v centrifuze chlazené na 4 °C při 3500 rpm 20 minut.

2. Supernatant jsme slili, přidali 10 ml sterilní vody a důkladně promíchali.
3. Opět jsme centrifugovali v centrifuze chlazené na 4 °C při 3500 rpm 20 minut.
4. Supernatant jsme slili, přidali 5 ml fyziologického roztoku a důkladně promíchali.
5. Opět jsme centrifugovali v centrifuze chlazené na 4 °C při 3500 rpm 20 minut.
6. Supernatant jsme slili, připipetovali 0,5 ml fyziologického roztoku, 3 ml FASANA A a 25 µl PROTEINÁZY K a obsah důkladně promíchali.
7. Inkubovali jsme 48 hodin při 37 °C.
8. Následně jsme provedli kroky č. 7 až č. 15 podle protokolu na izolaci DNA z plné krve.

5.2.1.3. Zjišťování koncentrace a kvality DNA

Koncentraci a čistotu DNA jsme měřili spektrofotometricky pomocí nanodropu. Koncentrace DNA se vypočítávala na základě absorbance při vlnové délce 260 nm, čistota se určila z poměrů absorbancí při vlnových délkách 260 a 280 nm. Koncentrace vzorků použitých v této práci byla vždy vyšší než 100 ng/µl a hodnota poměru absorbancí určujících čistotu DNA byla kolem 1,8.

Kontrolu, zda DNA není degradovaná, jsme prováděli elektroforeticky na 1% agarózovém gelu. Příprava gelu a průběh elektroforézy je uveden v kapitole 5.2.2.3.

5.2.1.4. Přechištění

V případě, že nebyla vyizolována čistá DNA, jsme prováděli přechištění pomocí fenol-chloroformové extrakce:

Postup

1. Do mikrozkušavky jsme napipetovali 0,5 ml DNA určené k přechištění a 0,5 ml směsi fenol-chloroform-isoamylalkohol a důkladně zvortexovali.
2. Následně jsme vzorek centrifugovali 5 minut při 10800 rpm.
3. Do čisté mikrozkušavky jsme odebrali horní, vodnou fázi.
4. K vodné fázi jsme přidali stejné množství směsi chloroform-isoamylalkohol a důkladně zvortexovali.
5. Vzorek jsme opět centrifugovali 5 minut při 10800 rpm.
6. Opět jsme do čisté mikrozkušavky odebrali horní, vodnou fázi.

7. K odebranému vzorku jsme přidali 1/10 objemu octanu amonného a 1 μ l glykogenu a vzorek jsme zvortexovali.
8. Připipetovali jsme 2,5násobek objemu ledového 100% ethanolu a opět zvortexovali.
9. Vzorek jsme centrifugovali 5 minut při 10800 rpm a následně slili supernatant.
10. Připipetovali jsme 500 μ l ledového 70% ethanolu, centrifugovali 5 minut při 10800 rpm a následně slili supernatant.
11. Předcházející krok jsme zopakovali ještě jednou.
12. Peletu jsme nechali vyschnout a následně ji rozpustili v odpovídajícím množství TE pufru.

5.2.2. Genotypizace pomocí PCR-RFLP

Genotypizaci polymorfismů rs10203174 a rs6819243 jsme prováděli na základě PCR s následným štěpením produktů restrikční endonukleázou.

5.2.2.1. PCR

Chemikálie

PCR H₂O

10x DreamTaq pufr (Thermo Fisher Scientific, USA)

5x Taq HotStart pufr (KAPA Biosystems, USA)

25 mM MgCl₂ (Thermo Fisher Scientific, USA)

25 mM MgCl₂ (KAPA Biosystems, USA)

dNTP mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

primery (Metabion international AG, Německo)

DreamTaq DNA polymeráza

- 5 U/ μ l (Thermo Fisher Scientific, USA)

Taq HotStart DNA polymeráza

- 5 U/ μ l (KAPA Biosystems, USA)

DMSO

- Dimethyl sulfoxide (SIGMA, Německo)

Postup

1. Primery jsme dle návodu naředili na koncentraci 10 μ M nebo 50 μ M. Přehled použitých primerů a jejich koncentrací je uveden v tabulce 4.

2. V laminárním boxu jsme do sterilní zkumavky připravili Master Mix na základě tabulky 5 na množství 100 reakcí. Pro analýzu rs10203174 byly pufr, MgCl₂ a polymeráza použity od firmy Thermo Fisher Scientific, pro analýzu rs6819243 od firmy KAPA Biosystems.
3. Master Mix jsme důkladně promíchali a rozpipetovali na mikrotitrační destičku ABgene (Thermo Scientific). Do každé jamky jsme pipetovali 24 µl reakční směsi.
4. V laminárním boxu určeném pro práci s DNA jsme do každé jamky (kromě 2 jamek určených k negativní kontrole) přidali 1 µl DNA v případě vzorků pacientů a 1,5 µl DNA v případě vzorků kontrolní skupiny. Více DNA kontrolní skupiny jsme přidávali z důvodu její horší kvality.
5. Jamky jsme zakapali silikonovým olejem a destičku přelepili fólií, aby nedošlo k odpaření vzorků.
6. Destičku jsme vložili do termocycleru a pustili program dle tabulky 6.
7. Výsledek amplifikace jsme kontrolovali elektroforeticky na 3% agarózovém gelu. (Příprava gelu a průběh elektroforézy je uveden v kapitole 5.2.2.3.)

Tabulka 4. Sekvence použitých primerů a jejich koncentrace

	forward/reverse primer	koncentrace
rs10203174	5' AAC ACT CTC ACA GAG ACT CAA TTA TTT GGG 3'	50 µM
	5' AAT TGC TGA GAT GTT GCA GCT CTT CTC AG 3'	
rs6819243	5' AAC CTT CAG GTT GGC CTT GAT GCC TC 3'	10 µM
	5' TTC ATC CCC AGG TCA GGA AAC TCC 3'	

Tabulka 5. Přehled reagentů reakční směsi na 1 reakci PCR, v µl

	rs10203174	rs6819243
H ₂ O	18,45	13,9
pufr	2,5	5
MgCl ₂	1,5	1,5
dNTP mix	0,5	0,5
F primer	0,5	1
R primer	0,5	1
DMSO	0	1
polymeráza	5	0,1

Tabulka 6. Přehled programů pro PCR reakce

	rs10203174		rs6819243	
	teplota (°C)	čas (s)	teplota (°C)	čas (s)
1. počáteční denaturace	96	180	95	180
2. denaturace	94	15	95	30
3. hybridizace	59,2	30	55,4	30
4. elongace	72	30	72	20
5. 34x opakování kroků 2–4				
6. elongace	72	180	72	20
7. ochlazení	10	10	10	10

5.2.2.2. Restrikční štěpení**Chemikálie**PCR H₂O

pufr

- 10x Buffer Tango (with BSA) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- 10x Buffer 0 (with BSA) (Thermo Fisher Scientific, USA)

enzymy

- Hin6I - 10 U/μl (Thermo Fisher Scientific, USA)
- ScrFI - 10 U/μl (Thermo Fisher Scientific, USA)

Produkty PCR jsme vystavili účinkům restrikčních endonukleáz, které štěpí DNA v konkrétních restrikčních místech. Na základě toho, zda dojde, či nedojde k rozštěpení DNA, můžeme rozlišit genotyp vzorku. Informace o štěpení PCR produktů jsou shrnuty v tabulce 7.

Tabulka 7. Přehled informací o restrikčním štěpení

	rs10203174	rs6819243
enzym	Hin6I	ScrFI
pufr	Tango	0
štěpená sekvence	5' G↓CGC 3'	5' CC↓NGG 3'
velikost neštěpeného PCR produktu (bp)/příslušná alela	125/C	259/C
velikosti naštěpených řetězců (bp)/příslušná alela	28+97/T	105+18+(74+34)+54/T

Postup

1. Do zkumavky jsme připravili reakční směs na množství 100 reakcí dle tabulky 8 a důkladně ji promíchali.
2. Směs jsme rozpipetovali na destičku, do každé jamky jsme pipetovali 10 μ l reakční směsi v případě rs10203174 a 15 μ l v případě rs6819243.
3. K reakční směsi jsme přidali 10 μ l resp. 5 μ l PCR produktů, tak aby byl celkový objem 20 μ l a pipetou jsme roztok promíchali.
4. Směs jsme inkubovali 24 hodin při teplotě 37 °C.
5. Výsledky restrikce jsme zjišťovali elektroforeticky na 10% (rs10203174) resp. 15% (rs6819243) polyakrylamidovém gelu.

Tabulka 8. Přehled reagensií reakční směsi na 1 reakci restrikčního štěpení, v μ l

	rs10203174	rs6819243
H ₂ O	7,5	12,5
pufr	2	2
enzym	0,5	0,5

5.2.2.3. Elektroforetická separace

Chemikálie

10x koncentrovaný TBE pufr

- 27,5 g H₃BO₃ (Sigma-Aldrich, USA)
- 54 g Tris
- 20 ml 0,5 M EDTA
- doplněno do 500 ml dH₂O

0,5x koncentrovaný TBE pufr

- 50 ml 10x koncentrovaný TBE pufr
- 950 ml dH₂O

agaróza (Sigma-Aldrich, USA)

0,5% ethidium bromid

- 0,125 g ethidium bromid (Sigma-Aldrich, USA)
- 25 ml dH₂O

Acrylamide 4K

- 30% roztok (Applichem GmbH, DE)

TEMED

- N, N, N', N' - Tetramethylethylenediamine (Sigma-Aldrich, USA)

APS

- 4 g 10% amonium persulfát (Sigma-Aldrich, USA)
- doplněno do 40 ml dH₂O

silan

- 99 ml 100% etanol
- 0,5 ml 99,5% CH₃COOH (Sigma-Aldrich, USA)
- 0,5 ml methacryloxypropyltrimethoxysilane (Sigma-Aldrich, USA)

hmotnostní marker

- Low 100 bp ladder (Thermo Fisher Scientific, USA)

nanášecí barva

- 0,01 g Orange II nebo Bromphenol-Blue-Xylen (Sigma-Aldrich, USA)
- 100 µl 0,5 M EDTA
- 40 ml glycerolu
- doplněno do 50 ml dH₂O

Postup

Kontrola degradace DNA probíhala na 1% agarózovém gelu a kontrola PCR produktů na 3% agarózovém gelu dle následujícího postupu:

1. V 250 ml 0,5x TBE pufru jsme rozpustili 2,5 g (1%) resp. 7,5 g (3%) agarózy.
2. Roztok jsme ohřívali v mikrovlnné troubě po dobu 7 min a poté jsme přidali 20 µl roztoku 0,5% ethidium bromidu.
3. Roztok jsme nalili do van s hřebínky a nechali ztuhnout.
4. Ztuhlý gel jsme vkládali do elektroforetické vany naplněné 0,5x TBE pufrem.
5. Do první jamky jsme napipetovali 0,5 µl hmotnostního markeru, do dalších jamek směs 7,6 µl DNA a 2,4 µl nanášecí barvy.
6. Elektroforéza běžela při napětí 70 V (1%) resp. 130 V (3%) po dobu 60 min (1%) resp. 25 min (3%).
7. DNA fragmenty jsme zviditelňovali pomocí UV transiluminátoru.

Zjišťování výsledků restrikce probíhalo na polyakrylamidovém gelu dle následujícího postupu:

1. V Erlenmeyerově baňce jsme smíchali roztok dle tabulky 9 a opatrně promíchali.
2. Směs jsme nalili do formy na přípravu polyakrylamidového gelu a položili na ni sklo, které jsme předtím potáhli silanem.
3. Po zpolymerizování jsme gel vyndali z formy a uchovávali v 0,5x TBE pufru.
4. Před samotnou elektroforézou jsme gel vložili na 5 minut do roztoku 0,5x TBE pufru a 0,5% ethidium bromidu.
5. Poté jsme gel vložili do elektroforetické vany naplněné 0,5x TBE pufrem a do každé jamky napipetovali směs 7,6 μ l restrikční směsi a 2,4 μ l nanášecí barvy.
6. Elektroforéza běžela při napětí 130 V po dobu 80 minut (rs10203174) resp. 120 minut (rs6819243).
7. DNA fragmenty jsme zviditelňovali pomocí UV transiluminátoru.

Tabulka 9. Přehled složek pro přípravu jednoho polyakrylamidového gelu (AA)

	10% AA	15% AA
H ₂ O	41 ml	31,5 ml
10x TBE	3,5 ml	3,5 ml
akrylamid	20 ml	30 ml
TEMED	65 μ l	65 μ l
APS	390 μ l	370 μ l

5.2.3. Genotypizace pomocí real-time PCR

Genotypizaci polymorfismů rs849135 a rs1552224 jsme prováděli pomocí TaqMan assayí.

Chemikálie

PCR H₂O

80x koncentrovaná TaqMan® Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)

- ID: C__1953903_10

80x koncentrovaná TaqMan® Genotyping Assay (Thermo Fisher Scientific, USA)

- ID: C__7601134_10

TaqMan® Genotyping Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)

TE pufr (pH=8).

Postup

1. Assay dodaný o koncentraci 80x jsme ředili na koncentraci 20x. Na 100 reakcí jsme tedy použili 12,5 µl assay o koncentraci 80x naředěný 37,5 µl TE pufru.
2. V laminárním boxu jsme do mikrozkušavky napipetovali 50 µl assaye, 350 µl H₂O a 500 µl Master Mixu.
3. Převrácením jsme roztok promíchali a rozpipetovali ho na mikrotitrační destičku MicroAmp určenou pro real-time PCR, do každé jamky jsme pipetovali 9 µl.
4. V laminárním boxu určeném pro práci s DNA jsme do každé jamky (kromě 2 jamek určených k negativní kontrole) přidali 1 µl DNA.
5. Destičku jsme přelepili optickou fólií, vložili jsme ji do real-time cycleru a spustili program dle tabulky 10.
6. Analýzu výsledků jsme prováděli pomocí programu 7300 System SDS software.

Tabulka 10. Program pro real-time PCR

		teplota (°C)	čas (s)	opakování
fáze č. 1	krok č. 1	95	600	1x
fáze č. 2	krok č. 1	92	15	40x
	krok č. 2	60	60	

5.3. Přístroje

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries, Inc., USA)

Centrifuga (Hermle Z300K, Německo)

Termocycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler (BIO-RAD, USA)

Nanodrop 2000SW (Thermo Fisher Scientific, Inc., USA)

Electronic Regulite Transiluminator (ULTRA LUM, Inc., USA)

tiskárna Sony Video Graphic Printer UP-895 MD

Blokový termostat (Grant QBA2, UK)

7300 Real Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, USA)

5.4. Statistické zpracování

Získaná data jsme nejprve otestovali pomocí Pearsonova χ^2 testu, zda rozložení genotypů v populaci odpovídá Hardy-Weinbergově rovnováze (HWE). Následně jsme pro každé SNP vypočítali hodnotu odds ratio (OR) rizikové alely.

OR je hodnota udávající míru pravděpodobnosti, s jakou se daný znak vyskytuje v jedné skupině oproti skupině druhé. V případě genetických studií se jako skupiny volí různé genotypy.

OR > 1 znamená, že v první skupině je vyšší pravděpodobnost výskytu daného znaku než ve skupině druhé.

OR < 1 znamená, že v první skupině je nižší pravděpodobnost výskytu daného znaku než ve skupině druhé.

OR = 1 znamená, že u obou skupin je stejná pravděpodobnost výskytu daného znaku.

Dále jsme zjišťovali rizikovost kombinací genotypů výpočtem genetického skóre. Dle genotypů byla každému jedinci pro každý polymorfismus přiřazena hodnota 0, 1 nebo 2. Hodnotu genetického skóre jsme určili součtem hodnot pro všechny jednotlivé polymorfismy. Pro přiřazování hodnot rizikovosti polymorfismů jsme použili dva různé modely. Dominantní model předpokládal, že ke změně míry rizika je dostačující jedna kopie rizikové alely. Kodominantní model testoval slabší účinky heteozygoty.

- Dominantní model: Homozygotům pro protektivní alelu byla přiřazována hodnota 0, heterozygotům 1 a homozygotům pro rizikovou alelu také 1.
- Kodominantní model: Homozygotům pro protektivní alelu byla přiřazována hodnota 0, heterozygotům 1 a homozygotům pro rizikovou alelu 2.

Hranice statistické významnosti byla u všech testů stanovena $p < 0,05$.

6. Výsledky

V této práci jsme provedli genotypizaci čtyř polymorfismů u pacientů s T2DM a zdravých kontrol. Analýza rs10203174 a rs6819243 probíhala pomocí metody PCR-RFLP. Polymorfismy rs849135 a rs1552224 jsme genotypizovali metodou real-time PCR. Pro rs6819243, rs849135 a rs1552224 byly analyzovány vzorky 712 pacientů a 752 kontrol. Vzhledem k nižší úspěšnosti genotypizace rs10203174 byl pro tento polymorfismus počet analyzovaných kontrol navýšen na 1034 vzorků, počet analyzovaných pacientů zůstal shodný s ostatními polymorfismy. Přehled počtů analyzovaných vzorků a úspěšnosti genotypizace naleznete v tabulce 11.

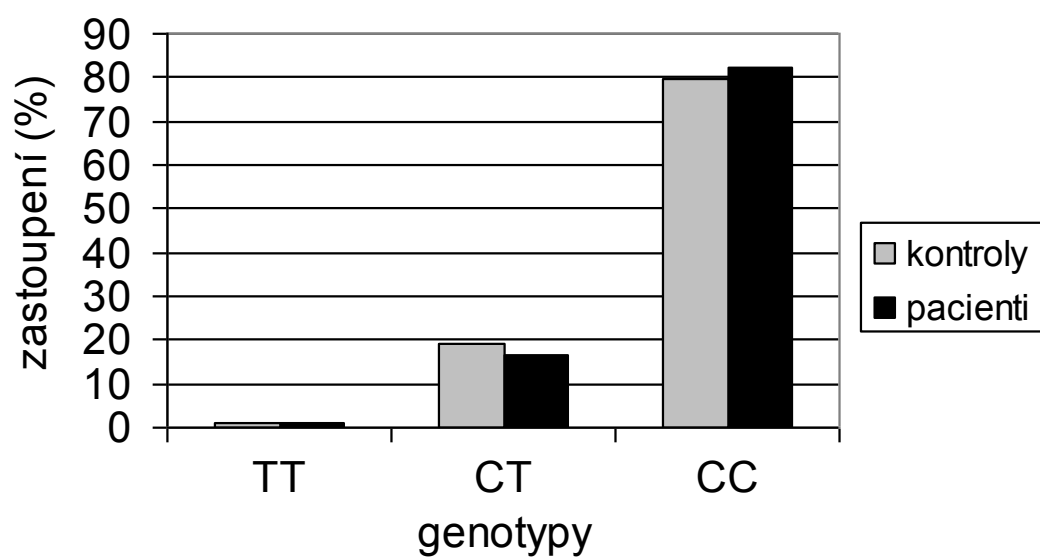
Tabulka 11. Úspěšnost genotypizace

		počet vzorků	počet genotypů	úspěšnost genotypizace
rs10203174	kontroly	1034	724	70,0 %
	pacienti	712	665	93,4 %
rs6819243	kontroly	752	699	93,0 %
	pacienti	712	710	99,7 %
rs849135	kontroly	752	724	96,3 %
	pacienti	712	704	98,9 %
rs1552224	kontroly	752	724	96,3 %
	pacienti	712	703	98,7 %

6.1. Frekvence alel a genotypů analyzovaných polymorfismů

6.1.1. *THADA* (rs10203174)

Námi zjištěné frekvence genotypů a alel v české populaci odpovídají frekvencím v blízkých evropských populacích (URL2) a nevybočují z HWE ($p = 0,89$ pro pacienty, $p = 0,82$ pro kontroly). Přehled rozložení genotypů popisuje graf 3. Frekvence alel naleznete v tabulce 12. Hodnoty OR pro jednotlivé modely jsou prezentovány v tabulce 13.



Graf 3. Frekvence genotypů polymorfismu rs10203174

Tabulka 12. Frekvence alel polymorfismu rs10203174

N = absolutní počet, % = frekvence v procentech

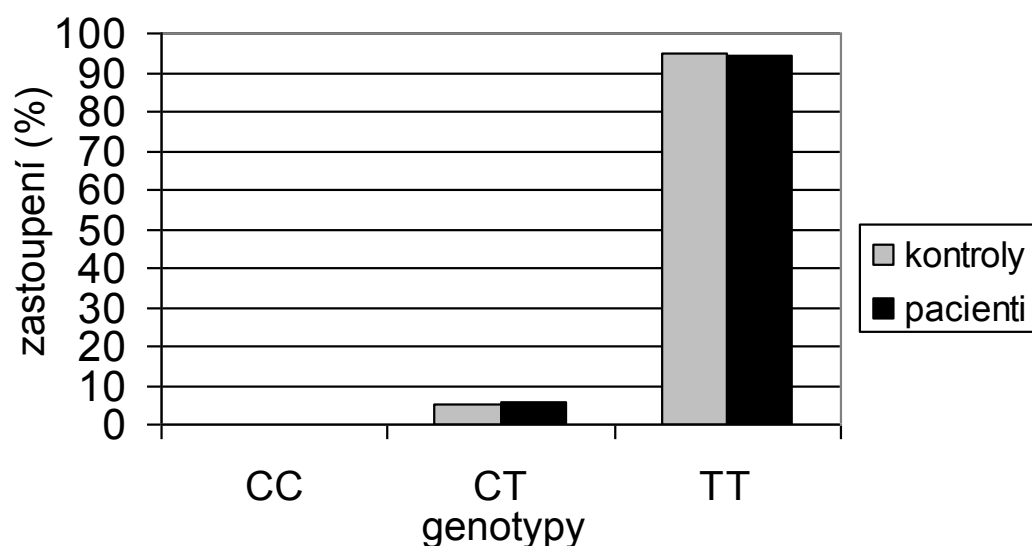
alela	kontroly		pacienti	
	N	%	N	%
T	156	10,77	123	9,25
C	1292	89,23	1207	90,75

Tabulka 13. Přehled hodnot OR dle různých modelů

	OR	P
TT vs CT	1,21 (95% CI 0,42 - 3,50)	0,73
TT vs CC	1,42 (95% CI 0,50 - 4,03)	0,50
TT vs CC+CT	1,38 (95% CI 0,49 - 3,91)	0,54
CT + TT vs CC	1,19 (95% CI 0,91 - 1,56)	0,20
CT vs CC	1,18 (95% CI 0,90 - 1,56)	0,24

6.1.2. *MAEA* (rs6819243)

Námi zjištěné frekvence genotypů a alel v české populaci odpovídají frekvencím v blízkých evropských populacích (URL3) a nevybočují z HWE ($p = 0,42$ pro pacienty, $p = 0,47$ pro kontroly). Přehled rozložení genotypů popisuje graf 4. Frekvence alel naleznete v tabulce 14. Hodnoty OR pro jednotlivé modely jsou prezentovány v tabulce 15.



Graf 4. Frekvence genotypů polymorfismu rs6819243

Tabulka 14. Frekvence alel polymorfismu rs6819243

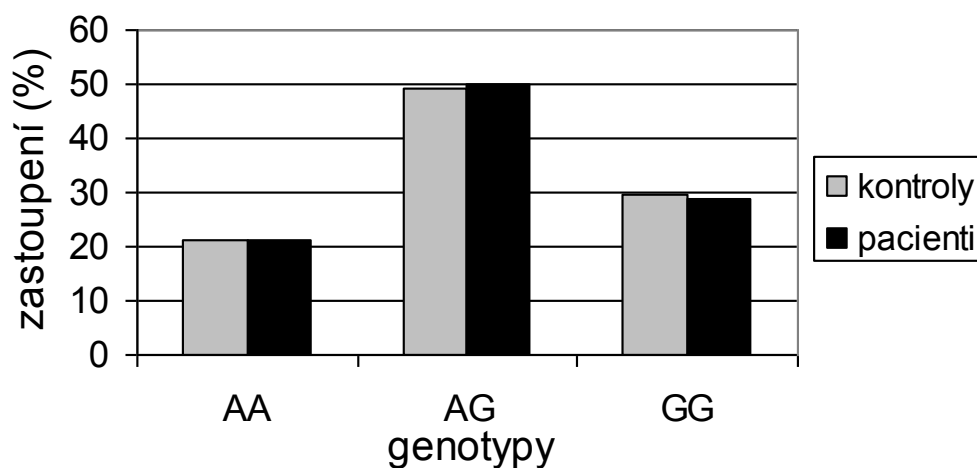
alela	kontroly		pacienti	
	N	%	N	%
C	37	2,65	42	2,96
T	1361	97,35	1378	97,04

Tabulka 15. Přehled hodnot OR dle různých modelů

	OR	P
CC vs CT	1,13 (95% CI 0,02 - 58,54)	0,95
CC vs TT	1,01 (95% CI 0,02 - 50,93)	1,00
CC vs TT+CT	1,02 (95% CI 0,02 - 51,26)	0,99
CT+CC vs TT	0,89 (95% CI 0,56 - 1,40)	0,62
CT vs TT	0,89 (95% CI 0,56 - 1,40)	0,61

6.1.3. *JAZF1* (rs849135)

Námi zjištěné frekvence genotypů a alel v české populaci odpovídají frekvencím v blízkých evropských populacích (URL4) a nevybočují z HWE ($p = 0,88$ pro pacienty, $p = 0,85$ pro kontroly). Přehled rozložení genotypů popisuje graf 5. Frekvence alel naleznete v tabulce 16. Hodnoty OR pro jednotlivé modely jsou prezentovány v tabulce 17.



Graf 5. Frekvence genotypů polymorfismu rs849135

Tabulka 16. Frekvence alel polymorfismu rs849135

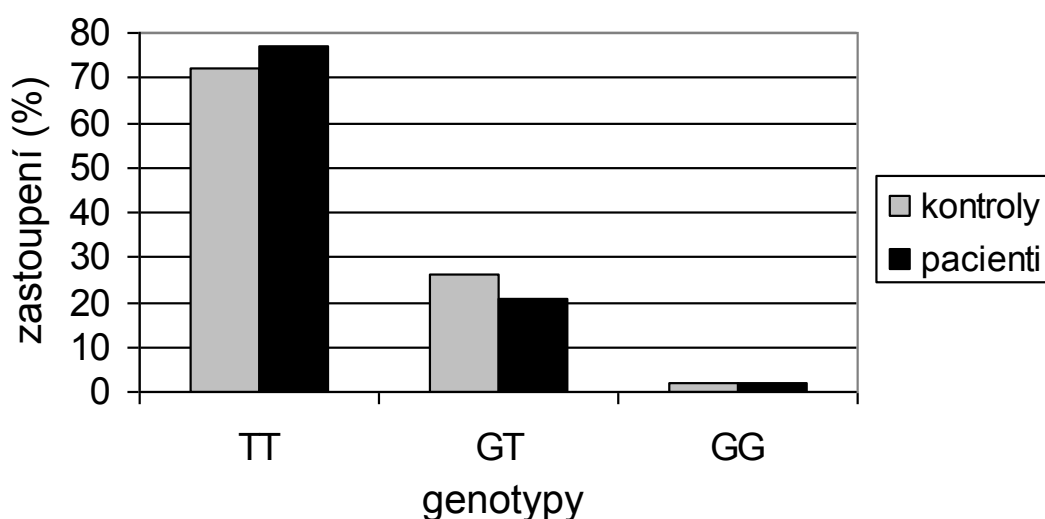
alela	kontroly		pacienti	
	N	%	N	%
A	665	45,93	652	46,31
G	783	54,07	756	53,69

Tabulka 17. Přehled hodnot OR dle různých modelů

	OR	P
GG vs AG	1,04 (95% CI 0,82 - 1,32)	0,75
GG vs AA	1,03 (95% CI 0,76 - 1,38)	0,86
GG vs AA+AG	1,04 (95% CI 0,82 - 1,30)	0,76
AG+GG vs AA	1,00 (95% CI 0,78 - 1,29)	0,99
AG vs AA	0,99 (95% CI 0,76 - 1,29)	0,93

6.1.4. *ARAP1* (rs1552224)

Námi zjištěné frekvence genotypů a alel v české populaci odpovídají frekvencím v blízkých evropských populacích (URL5) a nevybočují z HWE ($p = 0,16$ pro pacienty, $p = 0,36$ pro kontroly). Přehled rozložení genotypů popisuje graf 6. Frekvence alel naleznete v tabulce 18. Hodnoty OR pro jednotlivé modely jsou prezentovány v tabulce 19.



Graf 6. Frekvence genotypů polymorfismu rs1552224

Tabulka 18. Frekvence alel polymorfismu rs1552224

alela	kontroly		pacienti	
	N	%	N	%
T	1232	85,08	1231	87,55
G	216	14,92	175	12,45

Tabulka 19. Přehled hodnot OR dle různých modelů

	OR	P
GG vs GT	0,67 (95% CI 0,31 - 1,43)	1,05
GG vs TT	0,90 (95% CI 0,43 - 1,92)	0,79
GG vs TT+TG	0,84 (95% CI 0,40 - 1,78)	0,65
TG+GG vs TT	1,32 (95% CI 1,04 - 1,68)	0,02
TG vs TT	1,37 (95% CI 1,07 - 1,75)	0,01

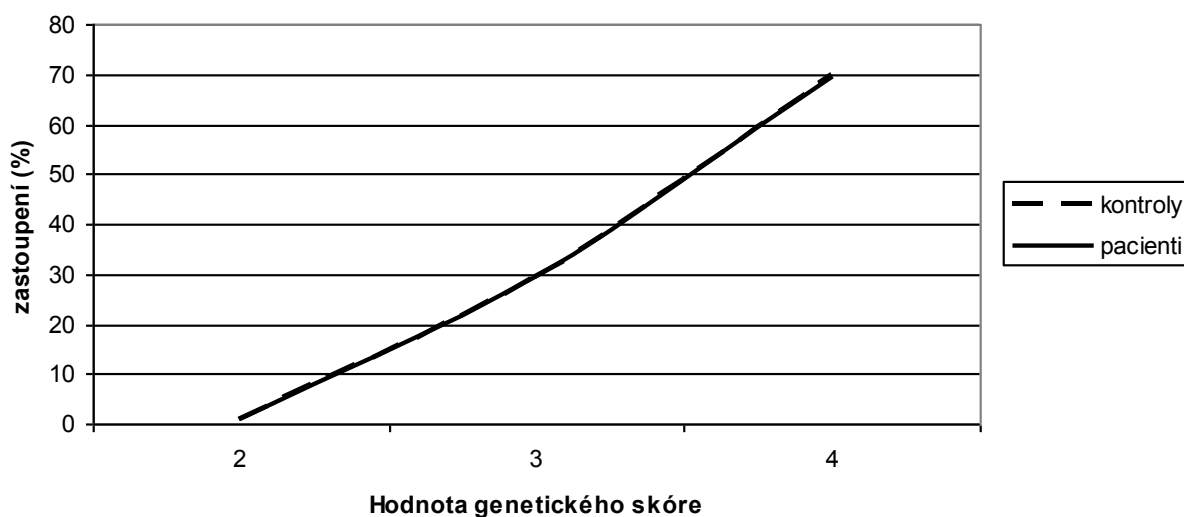
6.2. Genetické skóre

Na základě námi získaných výsledků jsme vypočítali genetické skóre pro polymorfismy rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224. Skóre jsme vypočítávali i pro polymorfismy, u kterých nebyla samostatně nalezena žádná signifikantní závislost s T2DM, na základě hypotézy, že míra rizika se může navyšovat s kombinacemi genotypů více polymorfismů nelineárně. Vzhledem k tomu, že pro výpočet genetického skóre je třeba úspěšné genotypizace u všech polymorfismů, stanovovali jsme hodnotu skóre pro 649 pacientů a 485 kontrol.

Genetické skóre jsme vypočítávali na základě dvou odlišných modelů. Při testování dominantního modelu jsme homozygotům pro protektivní alelu přiřazovali hodnotu 0, heterozygotům 1 a homozygotům pro rizikovou alelu také 1. U kodominantního modelu byla homozygotům pro protektivní alelu přiřazována hodnota 0, heterozygotům 1 a homozygotům pro rizikovou alelu hodnota 2. Každému jedinci vždy byla přiřazena výsledná hodnota odpovídající součtu hodnot ze všech čtyřech polymorfismů.

Dominantní model

V dominantním modelu se mezi skupinami kontrol a pacientů nepodařilo prokázat žádné signifikantní rozdíly v zastoupení kombinací genotypů. Porovnání frekvencí jednotlivých hodnot genetického skóre naleznete v grafu 7, zastoupení jednotlivých hodnot genetického skóre naleznete v tabulce 20.



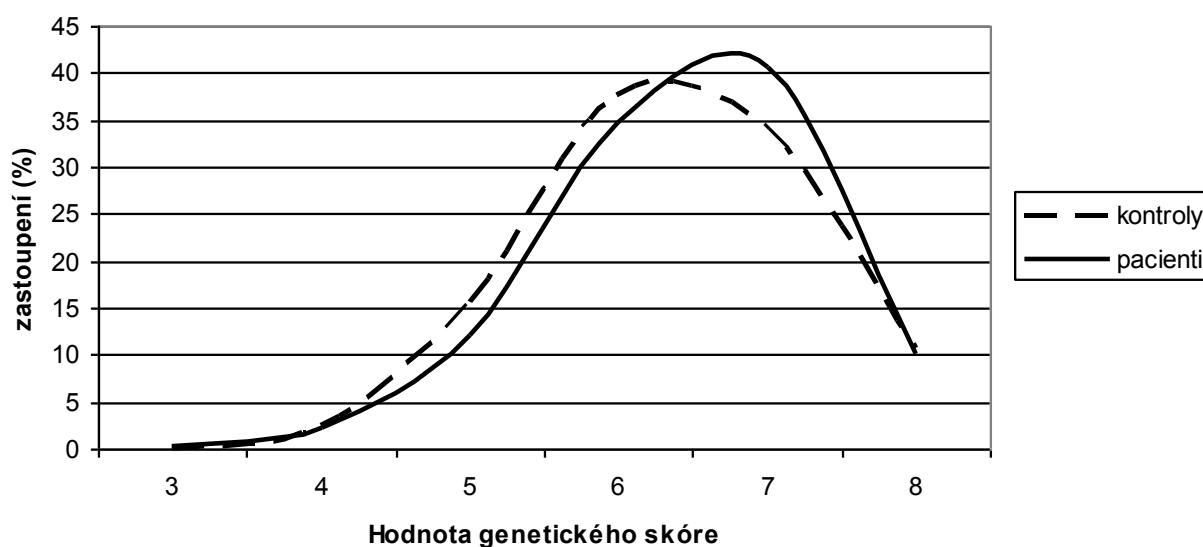
Graf 7. Frekvence hodnot genetického skóre dominantního modelu

Tabulka 20. Frekvence hodnot genetického skóre dominantního modelu

	2		3		4	
	N	%	N	%	N	%
kontroly	4	0,82	143	29,48	338	69,69
pacienti	7	1,08	191	29,43	451	69,49

Kodominantní model

Porovnání frekvencí jednotlivých hodnot genetického skóre naleznete v grafu 8. Pacienty i kontroly jsme na základě hodnoty genetického skóre rozdělili do dvou skupin. Mezi skupinami s nižší hodnotou skóre (hodnota skóre 0–6) a rizikovější skupinou (hodnota skóre 7–8) jsme detekovali statisticky významný ($p = 0,04$) rozdíl. Hodnota OR pro hodnotu skóre 7–8 je 1,29 (95% CI 1,02 – 1,63). Zastoupení jednotlivých hodnot genetického skóre naleznete v tabulce 21.



Graf 8. Frekvence hodnot genetického skóre kodominantního modelu

Tabulka 21. Frekvence hodnot genetického skóre kodominantního modelu

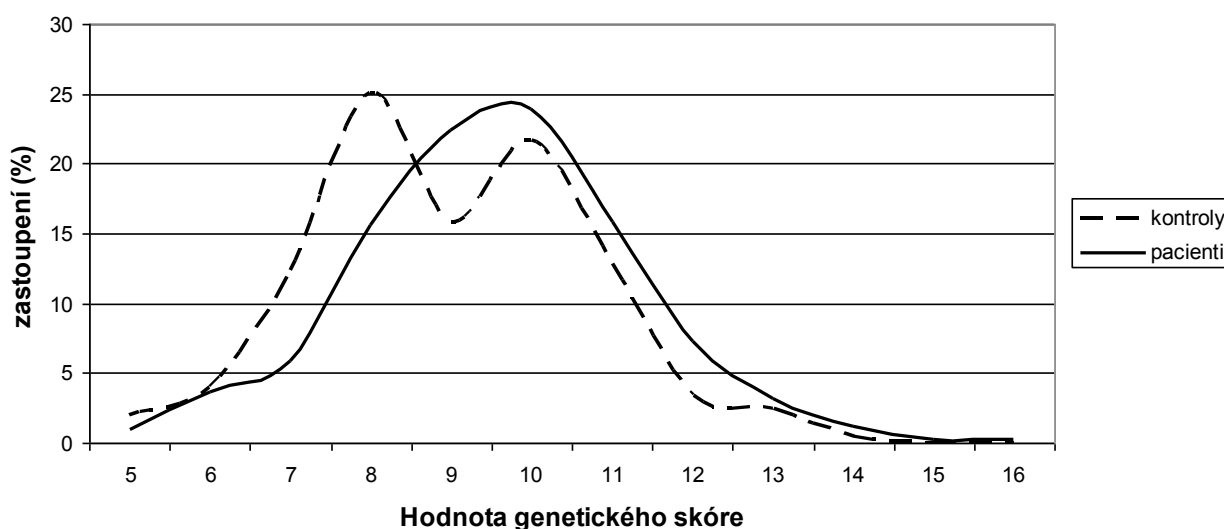
	3		4		5		6		7		8	
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
kontroly	0	0,00	12	2,47	75	15,46	182	37,53	165	34,02	51	10,52
pacienti	1	0,15	15	2,31	78	12,02	225	34,67	264	40,68	66	10,17

6.2.1. Celkové genetické skóre

Jak již bylo v úvodu práce zmíněno, tato diplomová práce vznikla jako součást většího projektu zaměřeného na analýzu genetické determinace T2DM. V rámci tohoto projektu je plánováno s genotypizací většího množství polymorfismů. V současné době jsou zanalyzovány další 4 SNPs. Jedná se o rs2943640 v genu IRS1, rs7903146 v genu TCF7L2, rs 4402960 v genu IGF2BP2 a rs17817449 v genu FTO. Na základě získaných dat o těchto polymorfismech jsme vytvořili genetické skóre zahrnující všech 8 dosud genotypizovaných polymorfismů. Výpočet tohoto skóre byl proveden na základě výsledků pro 203 kontrol a 443 pacientů.

Vzhledem k nefunkčnosti dominantního modelu pro polymorfismy rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224 jsme u celkového skóre použili pouze kodominantní model. Porovnání frekvencí jednotlivých hodnot genetického skóre naleznete v grafu 9, zastoupení jednotlivých hodnot genetického skóre naleznete v tabulce 22.

Na základě hodnoty genetického skóre jsme pacienty i kontroly rozdělili do několika skupin. Hodnoty OR pro jednotlivé skupiny naleznete v tabulce 23.



Graf 9. Frekvence hodnot genetického skóre

Tabulka 22. Frekvence hodnot genetického skóre

	kontroly		pacienti	
	N	%	N	%
5	4	1,97	4	0,90
6	8	3,94	16	3,61
7	25	12,32	26	5,87
8	51	25,12	69	15,58
9	32	15,76	99	22,35
10	44	21,67	106	23,93
11	26	12,81	70	15,80
12	7	3,45	32	7,22
13	5	2,46	14	3,16
14	1	0,49	5	1,13
15	0	0,00	1	0,23
16	0	0,00	1	0,23

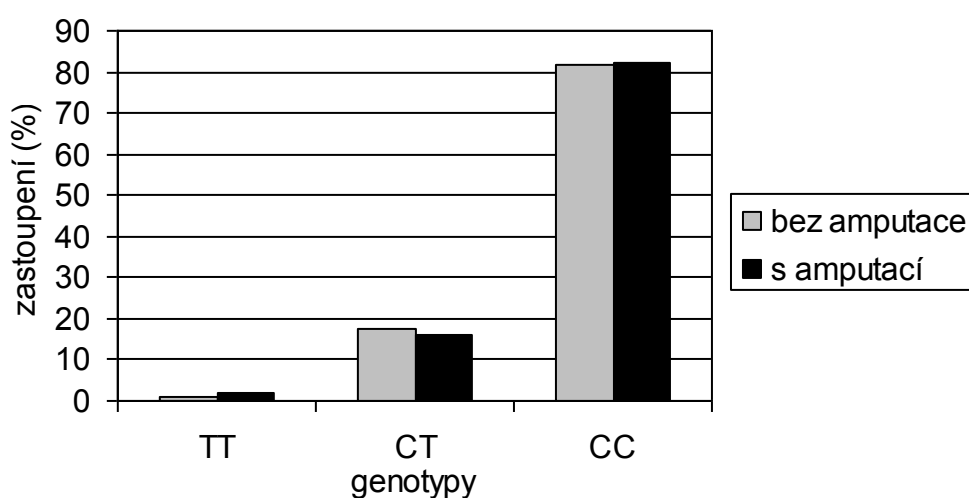
Tabulka 23. Hodnoty OR pro skupiny rozdělené dle hodnot genetického skóre

	OR	P
0–8	1	
9–16	2,18 (95% CI 1,54-3,10)	<0,0001
11–16	2,41 (95% CI 1,53-3,80)	0,0001

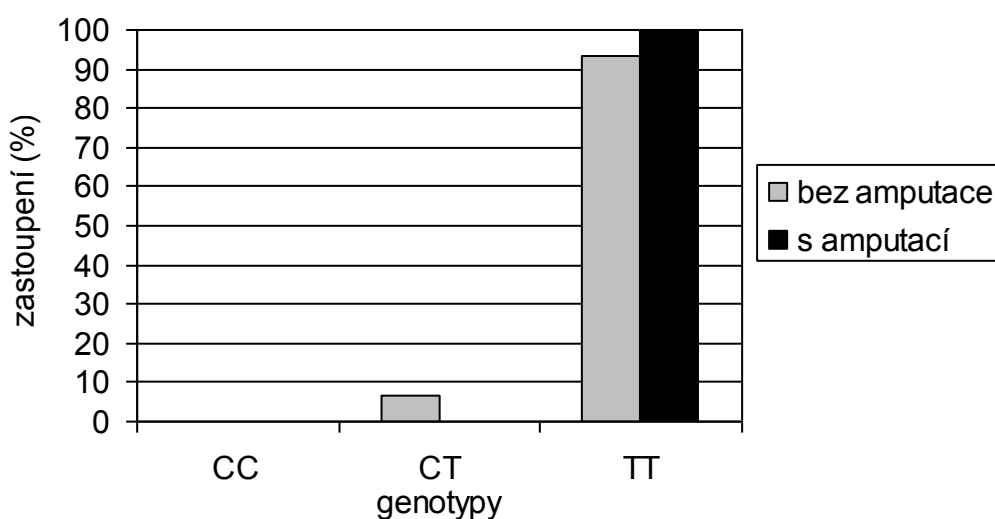
6.3. Asociace genotypů s komplikacemi a způsobem léčby diabetu

6.3.1. Syndrom diabetické nohy

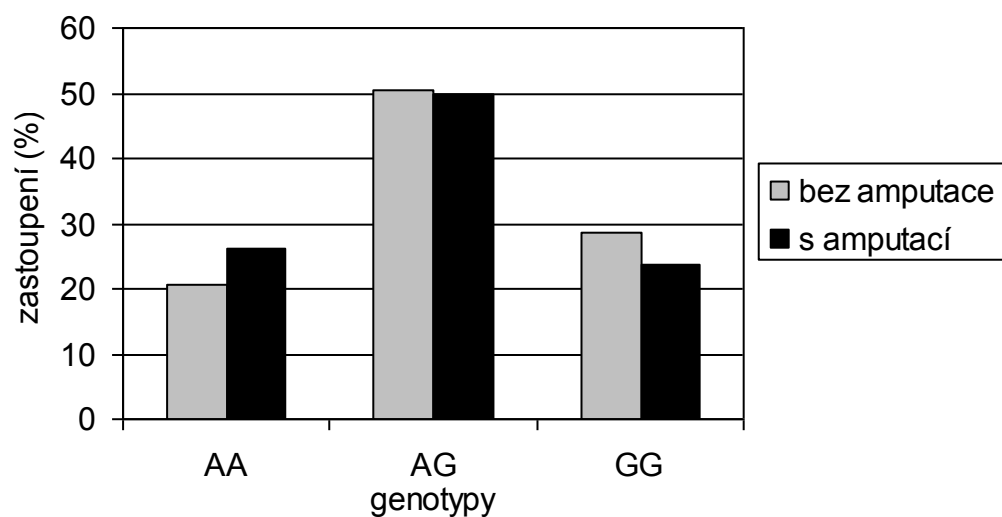
Na základě výsledků genotypizace T2DM pacientů jsme zjišťovali rozdíly ve frekvencích jednotlivých genotypů mezi diabetiky s různým stupněm závažnosti syndromu diabetické nohy. Diabetiky jsme rozdělili do dvou skupin. První skupinu tvoří pacienti, kteří syndrom diabetické nohy nemají, nebo mají jen mírný průběh. Do druhé skupiny jsme zařadili pacienty, kterým musela být noha amputována. Rozdíly ve frekvencích genotypů pro jednotlivé polymorfismy jsou prezentovány v grafech 10–13. Přehled rizikovosti alel naleznete v tabulce 24.



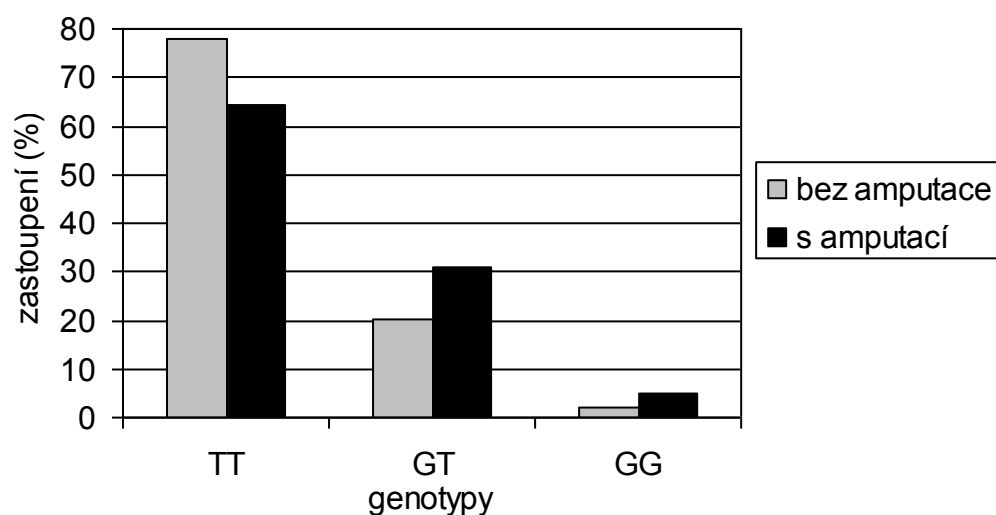
Graf 10. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs10203174



Graf 11. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs6819243



Graf 12. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs849135



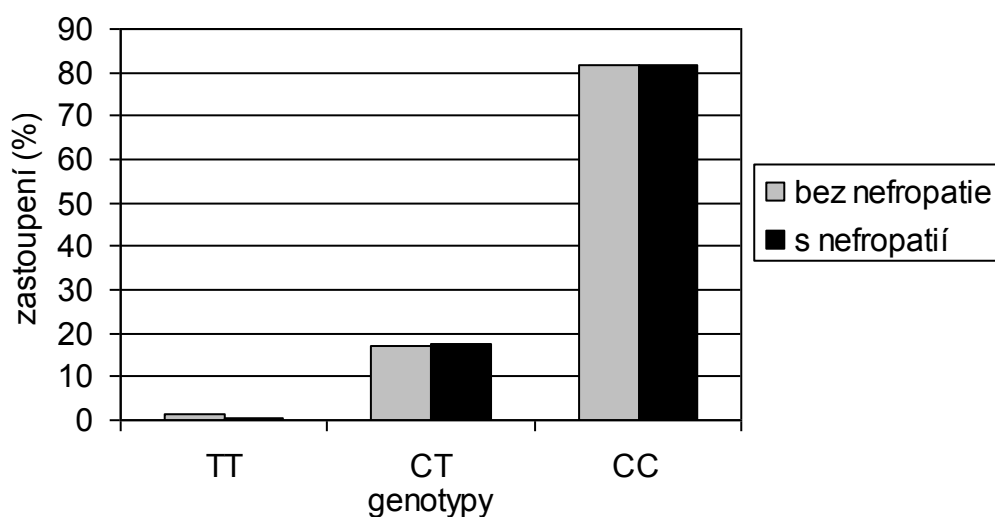
Graf 13. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs1552224

Tabulka 24. Hodnoty OR pro jednotlivé rizikové alely

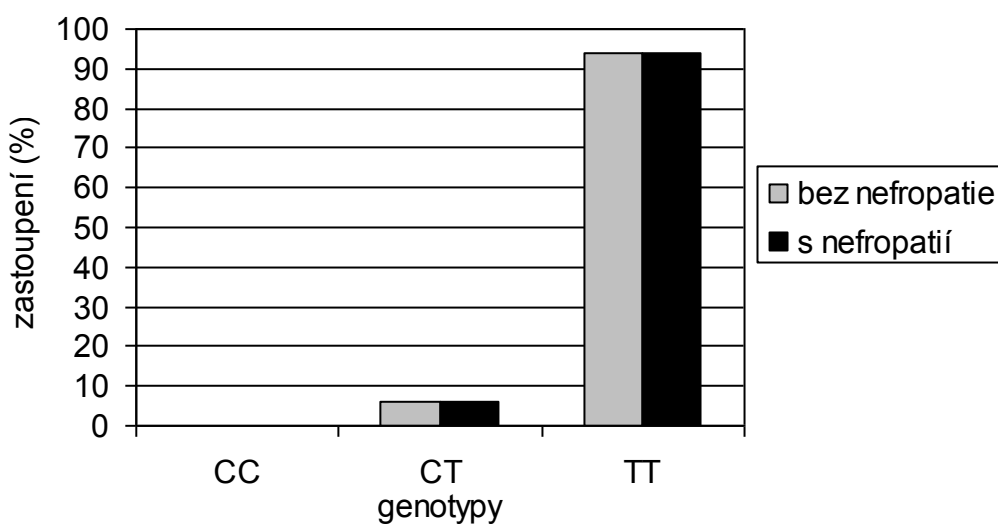
	model	OR	P
rs10203174	TT+CT vs CC	1,01 (95% CI 0,48 - 2,13)	0,98
rs6819243	CT vs TT	6,11 (95% CI 0,37 - 101,04)	0,21
rs849135	GG vs AA	1,52 (95% CI 0,63 - 3,70)	0,35
rs1552224	TT vs GT+TT	1,94 (95% CI 1,01 - 3,76)	<0,05

6.3.2. Nefropatie

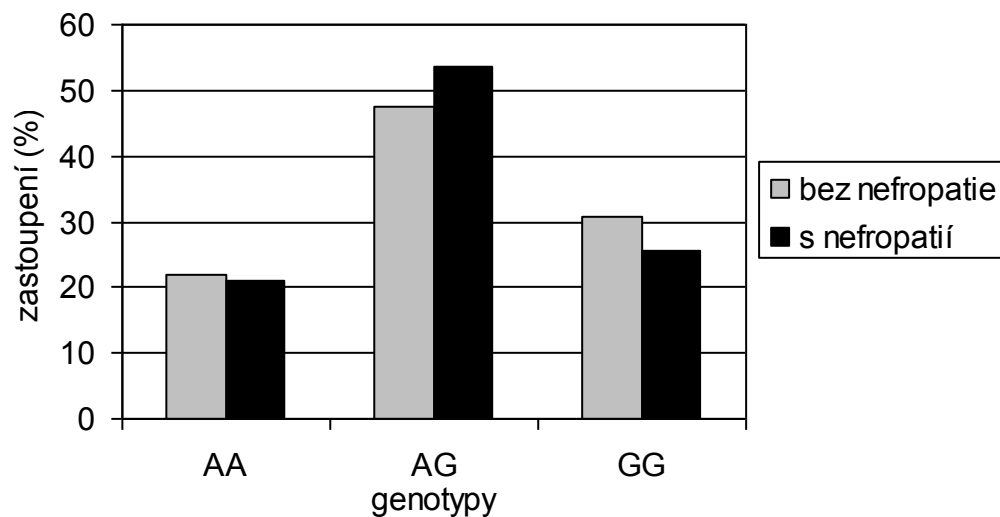
V naší práci jsme dále porovnávali rozdíly v rozložení genotypů mezi diabetiky s bezproblémovou funkcí ledvin a těch, u kterých se projevila nefropatie. Rozdíly ve frekvencích genotypů pro jednotlivé polymorfismy jsou prezentovány v grafech 14–17. Přehled rizikovosti alel naleznete v tabulce 25.



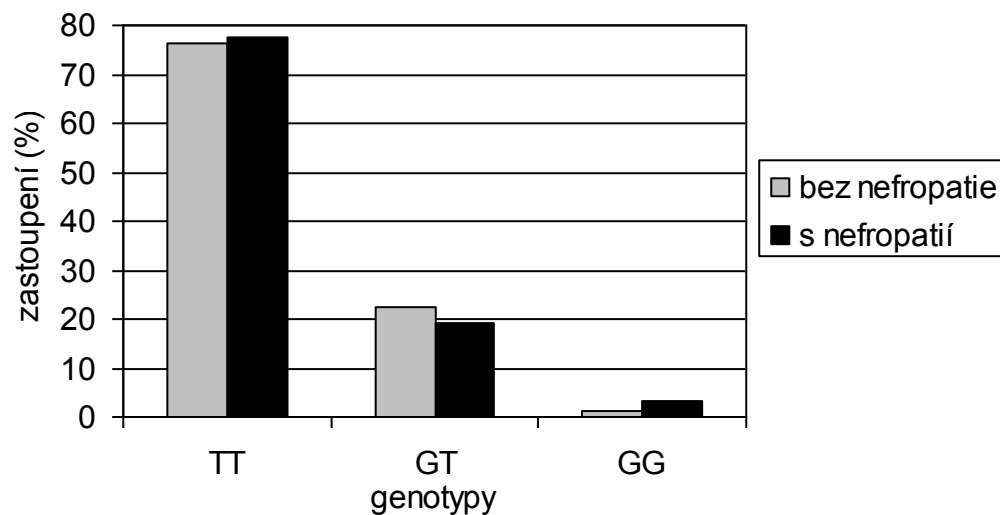
Graf 14. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs10203174



Graf 15. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs6819243



Graf 16. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs849135



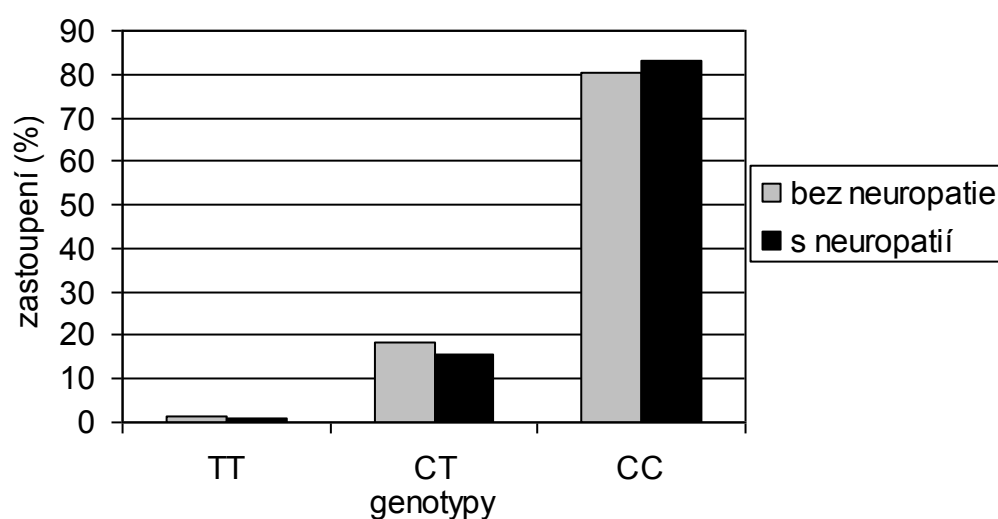
Graf 17. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs1552224

Tabulka 25. Hodnoty OR pro jednotlivé rizikové alely

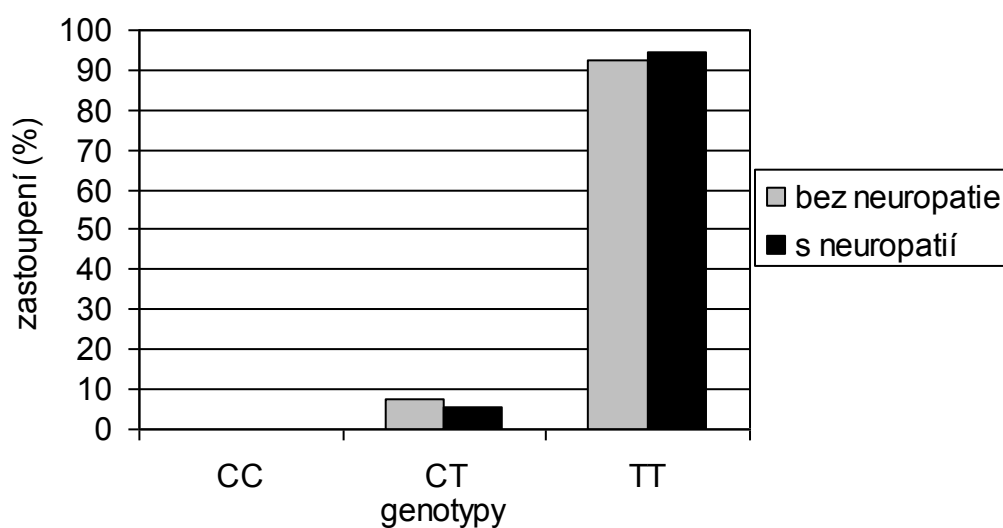
	model	OR	P
rs10203174	TT vs CC	2,20 (95% CI 0,44 - 11,00)	0,34
rs6819243	CT vs TT	1,02 (95% CI 0,54 - 1,93)	0,95
rs849135	GG vs AG+GG	1,30 (95% CI 0,92 - 1,83)	0,14
rs1552224	TT+GT vs GG	2,52 (95% CI 0,84 - 7,61)	0,10

6.3.3. Neuropatie

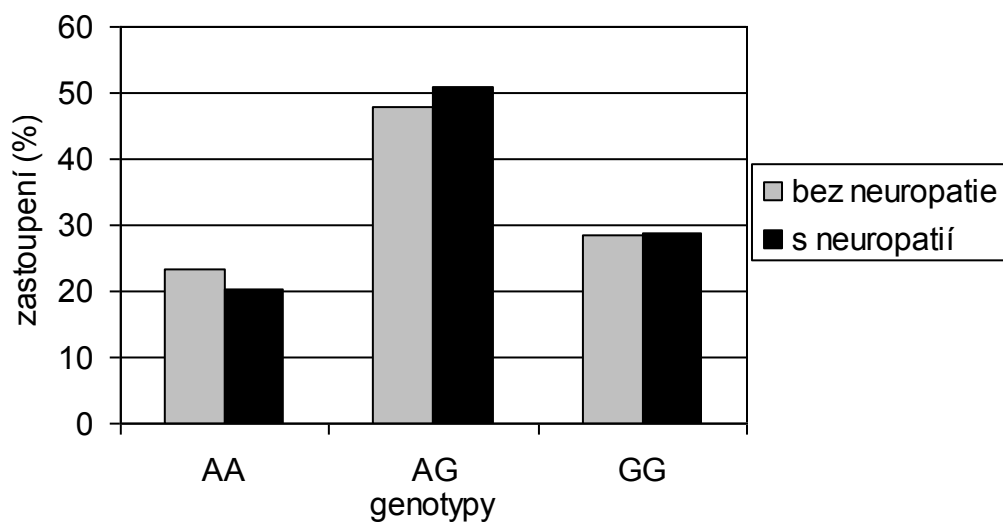
Dalšími z porovnávaných kritérií byly komplikace spojené s funkcí nervové soustavy. Rozdíly ve frekvencích genotypů pro jednotlivé polymorfismy mezi diabetiky bez poruchy nervové soustavy a pacienty s projevy neuropatie jsou prezentovány v grafech 18–21. Přehled rizikovosti alel naleznete v tabulce 26.



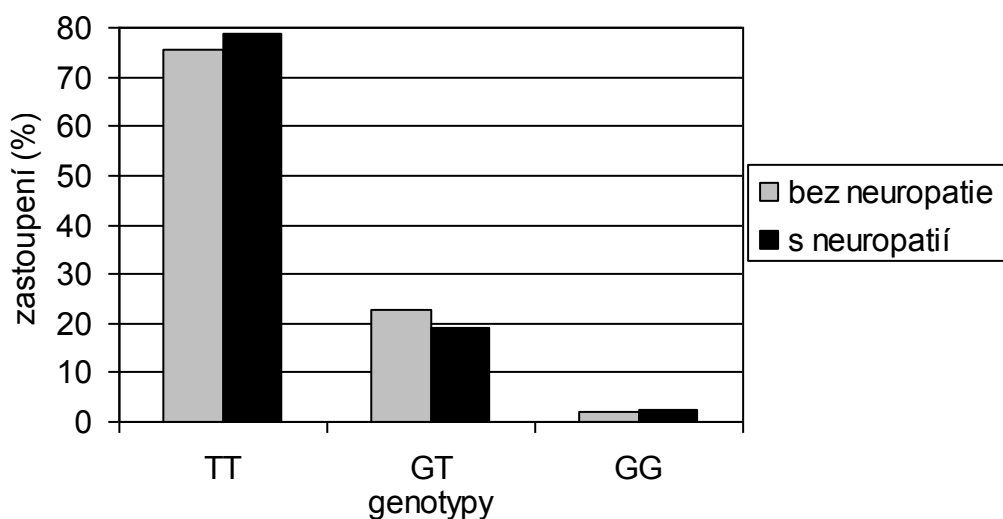
Graf 18. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs10203174



Graf 19. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs6819243



Graf 20. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs849135



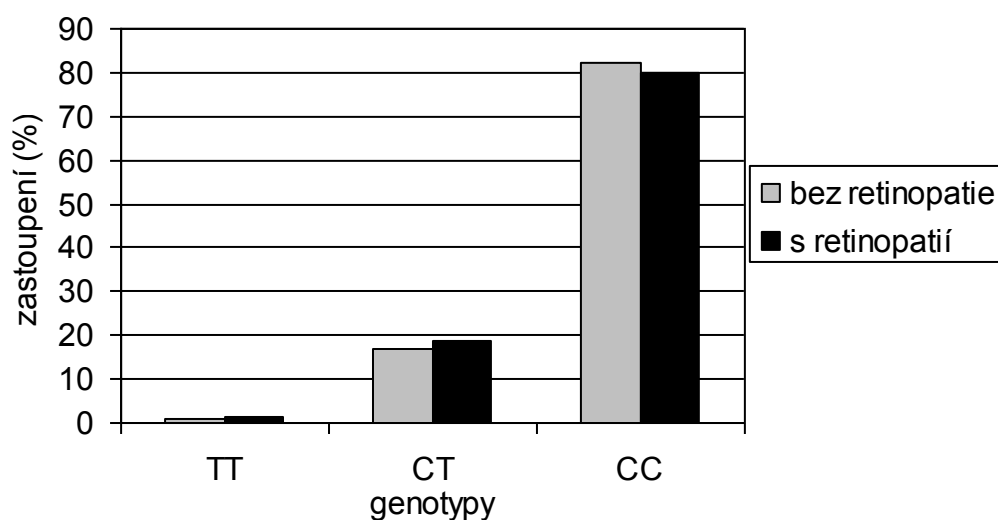
Graf 21. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs1552224

Tabulka 26. Hodnoty OR pro jednotlivé rizikové alely

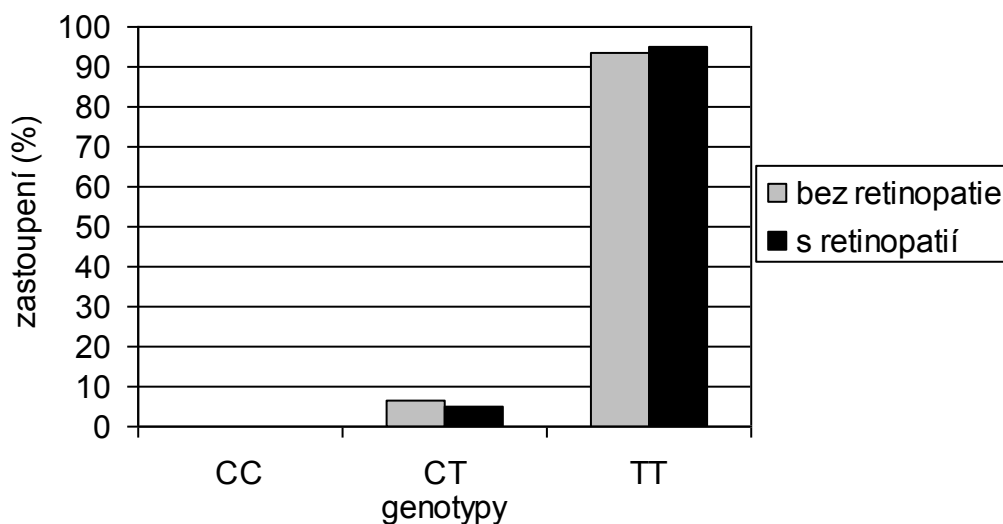
	model	OR	P
rs10203174	TT+CT vs CC	1,21 (95%CI 0,83 - 1,75)	0,32
rs6819243	CT vs TT	1,36 (95%CI 0,72 - 2,57)	0,34
rs849135	AA vs AG+GG	1,21 (95%CI 0,83 - 1,76)	0,32
rs1552224	GG+GT vs TT	1,20 (95%CI 0,83 - 1,73)	0,34

6.3.4. Retinopatie

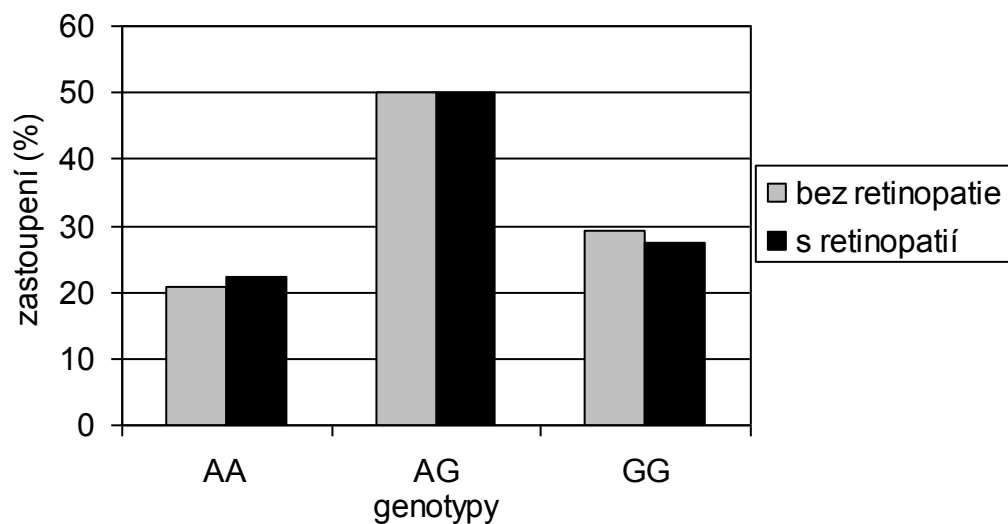
Míru asociace genotypů s projevem komplikace jsme zjišťovali také pro retinopatii. Rozdíly ve frekvencích genotypů pro jednotlivé polymorfismy mezi skupinou diabetiků bez retinopatie a s touto komplikací jsou prezentovány v grafech 22–25. Přehled rizikovosti alel naleznete v tabulce 27.



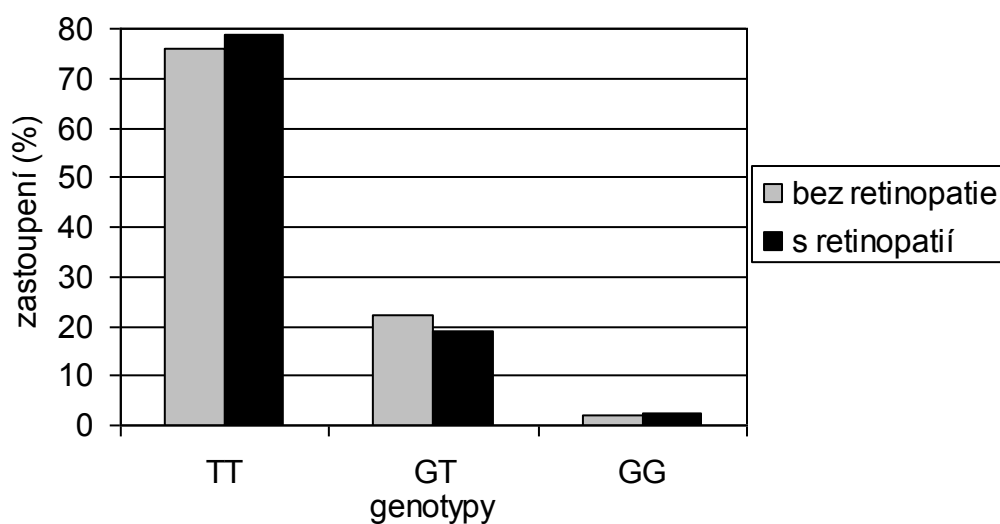
Graf 22. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs10203174



Graf 23. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs6819243



Graf 24. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs849135



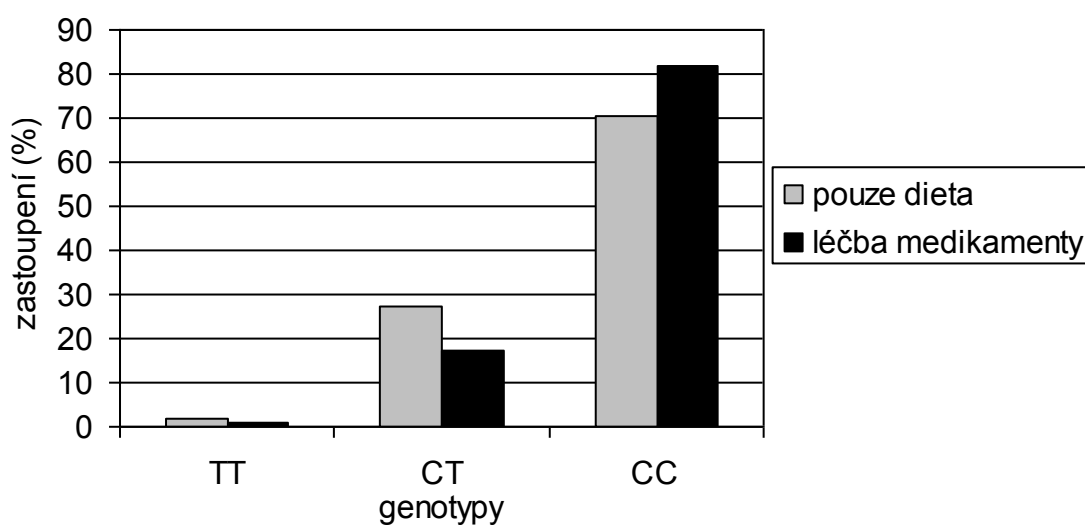
Graf 25. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs1552224

Tabulka 27. Hodnoty OR pro jednotlivé rizikové alely

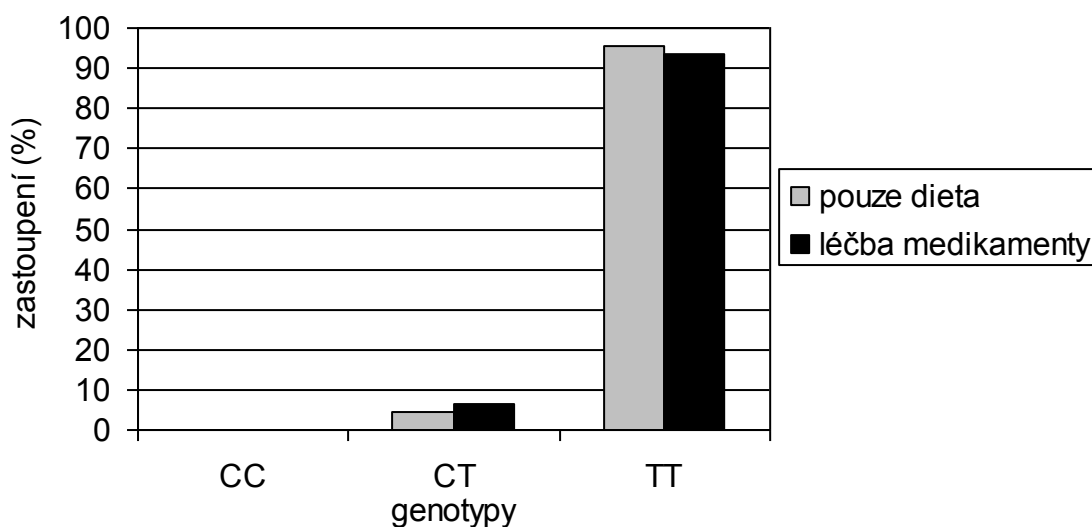
	model	OR	P
rs10203174	CC vs CT+TT	1,15 (95%CI 0,80 - 1,66)	0,45
rs6819243	CT vs TT	1,30 (95%CI 0,66 - 2,57)	0,45
rs849135	GG vs AA	1,15 (95%CI 0,73 - 1,79)	0,55
rs1552224	GG+GT vs TT	1,17 (95%CI 0,80 - 1,69)	0,42

6.3.5. Způsob léčby diabetu

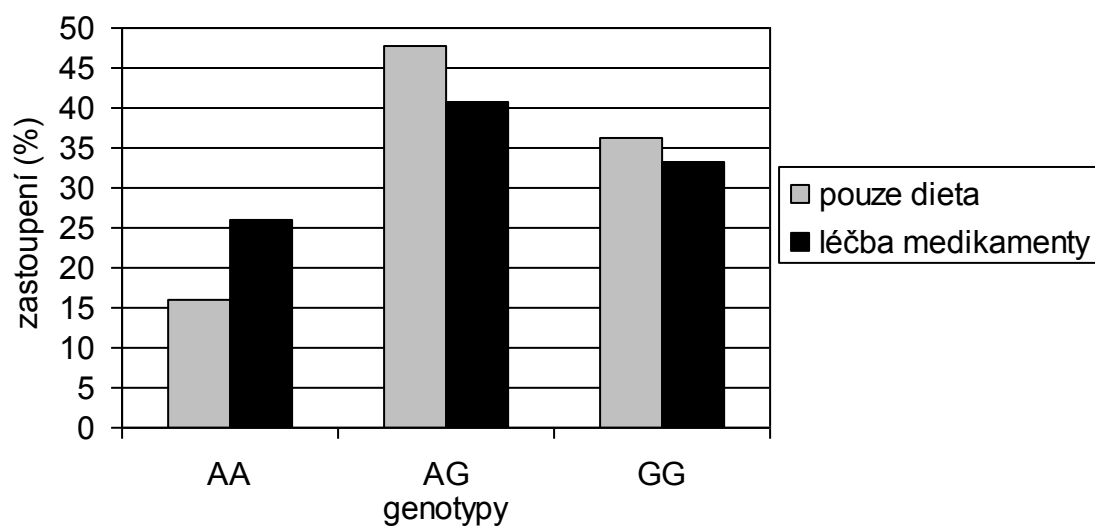
Míru závislosti rozložení genotypů jsme určovali i pro způsob léčby, kterým jsou diabetici léčeni. Pro porovnání jsme pacienty rozdělili do dvou skupin. V první skupině jsou zařazeni diabetici, pro které je dostačující léčba pouze dietou. Druhou skupinu tvoří pacienti, jejichž terapie vedle dodržování diety obsahuje také podávání perorálních antidiabetik anebo inzulínu. Rozdíly ve frekvencích genotypů pro jednotlivé polymorfismy jsou prezentovány v grafech 26–29. Přehled rizikovosti alel naleznete v tabulce 28.



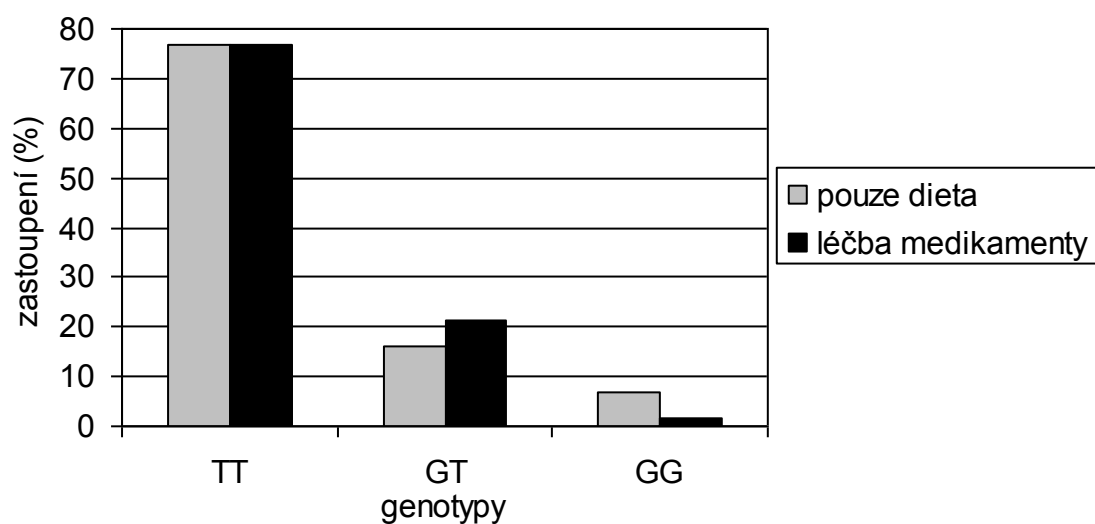
Graf 26. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs10203174



Graf 27. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs6819243



Graf 28. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs849135



Graf 29. Přehled rozložení genotypů polymorfismu rs1552224

Tabulka 28. Hodnoty OR pro jednotlivé rizikové alely

	model	OR	P
rs10203174	TT+CT vs CC	1,89 (95%CI 1,01 - 3,55)	<0,05
rs6819243	CT vs TT	1,40 (95%CI 0,33 - 6,01)	0,65
rs849135	GG+AG vs AA	1,86 (95%CI 0,81 - 4,28)	0,14
rs1552224	GG vs GT+TT	4,24 (95%CI 1,14 - 15,81)	0,03

7. Diskuze

Naše práce se zaměřila na zjišťování asociace genotypů u vybraných polymorfismů s rizikem manifestace diabetu druhého typu. Polymorfismy jsme ke genotypizaci vybírali na základě jejich rizikovosti v britské populaci. Analýzu jsme prováděli pro rs10203174 nacházejícím se v genu *THADA*, který kóduje protein asociovaný s adenomem štítné žlázy hrajícím pravděpodobně roli v apoptotické dráze (Drieschner et al., 2007). Dále pro rs6819243, který se nachází v genu *MAEA*, jehož produkt asociuje s maturujícími erytroblasty (Hanspal et al., 1998). Námi analyzovanými polymorfismy byly i rs849135 v genu *JAZF1*, jehož exprese ovlivňuje proliferaci a diferenciaci myogenních buněk (Koontz et al., 2001), a rs1552224. Ten se nachází v genu *ARAPI1*, který ovlivňuje mezibuněčnou signalizaci (Miura et al., 2002) a hladinu glukózy a inzulínu (Nielsen et al., 2011).

Ke genotypizaci jsme použili vzorky 712 pacientů s T2DM a 752 zdravých kontrol. Pro rs10203174 jsme z důvodu menší úspěšnosti genotypizace analyzovali 1034 kontrol. Na základě výsledků jsme vypočetli frekvenci a hodnotu OR rizikových alel pro manifestaci T2DM i jeho komplikací a dále sílu asociace kombinací rizikových genotypů s T2DM. Genetické skóre bylo z důvodu nutnosti úspěšné genotypizace pro všechny čtyři polymorfismy stanoveno na podkladě výsledků 649 pacientů a 485 kontrol.

***THADA* (rs10203174)**

Náš výzkum ukázal, že v české populaci je frekvence rizikové alely C 89 %, u pacientů s T2DM byla frekvence o 2 % vyšší. Homozygot CC má o 20 % vyšší riziko T2DM, avšak tato hodnota je statisticky nevýznamná ($p = 0,20$). V britské populaci je frekvence rizikové alely také 89 % a její OR je 1,10 (Talmud et al., 2014). Meta-analýza obsahující genotypy několika desítek tisíc pacientů i kontrol s evropským původem přiřazuje alele C hodnotu OR 1,14 (Morris et al., 2012).

***MAEA* (rs6819243)**

Frekvence rizikové alely T v našem výzkumu na české populaci byla u pacientů s T2DM i u zdravých kontrol 97 %. Homozygot TT má 1,12x vyšší riziko T2DM, avšak tato hodnota je statisticky nevýznamná ($p = 0,61$). V britské populaci je frekvence rizikové

alely také 96 % a její OR je 1,32 (Talmud et al., 2014). Výsledky meta-analýzy určují pro evropskou populaci hodnotu OR 1,07 (Morris et al., 2012).

JAZF1 (rs849135)

Riziková alela A tohoto polymorfismu je v naší populaci zastoupena s frekvencí 46 % u pacientů i kontrol. Homozygot AA má o 3 % vyšší riziko T2DM, avšak tento rozdíl je statisticky nevýznamný ($p = 0,86$). V britské populaci je naopak rizikovou variantou alela G, přinášející riziko 14 %. Frekvence alely G je v britské populaci 52 %, alela A má zastoupení 48 % (Talmud et al., 2014). Podle meta-analýzy je v evropské populaci rizikovou alelou G s hodnotou OR 1,11 (Morris et al., 2012).

ARAPI (rs1552224)

Na české populaci se nám podařilo statisticky významně ($p = 0,01$) prokázat asociaci tohoto polymorfismu s T2DM. Homozygot TT má 1,37x vyšší riziko diabetu než nositel jiného genotypu. Frekvence rizikové alely T je v naší populaci 85 %, u pacientů s T2DM byla frekvence 88 %. V britské populaci je frekvence rizikové alely 81 % a její OR je 1,14 (Talmud et al., 2014). Meta-analýzy naznačují u jedinců s evropským původem hodnotu OR 1,11 (Morris et al., 2012), resp. 1,14 (Voight et al., 2010). Pro východní Asii vychází OR 1,16 (Cho et al., 2011), v jižní Asii 1,14 (Kooner et al., 2011). Žádná asociace polymorfismu rs1552224 s T2DM naopak nebyla prokázána v pákistánské populaci (Rees et al., 2011).

Genetické skóre

Naše výsledky naznačují, že kombinace genotypů v polymorfismech rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224 jsou u české populace signifikantně asociovány s T2DM. U jedinců, kteří jsou pro všechny čtyři polymorfismy dohromady nositeli jedné nebo žádné protektivní alely, je riziko manifestace onemocnění zvýšeno o téměř 30 %.

Syndrom diabetické nohy

Signifikanční rozdíly ve frekvencích genotypů mezi skupinami pacientů s amputací a bez amputace nohy byly nalezeny pouze u polymorfismu rs1552224 ($p < 0,05$). Alela G tohoto SNP zvyšuje svému nositeli o 94 % riziko amputace. S ohledem na pravděpodobnost manifestace T2DM má však tato alela protektivní vliv.

Nefropatie

Pro tuto komplikaci nebyly žádné signifikantní asociace s genotypy nalezeny. U polymorfismu rs6819243 bylo rozložení genotypů u pacientů s nefropatií i bez ní téměř totožné, OR alely T je 1,02 ($p = 0,95$). U polymorfismů rs10203174, rs849135 a rs1552224 byly rozdíly výraznější, nicméně nevýznamně, s hodnotami $p = 0,34$, $0,14$, resp. $0,10$. Alela G rs1552224, která působí protektivně proti rozvoji diabetu, u nefropatie přináší zvýšení rizika této komplikace.

Neuropatie

Ani u neuropatie se nám nepodařilo prokázat signifikantní rozdíly ve frekvencích genotypů u diabetiků s touto komplikací a bez ní ($p = 0,32 - 0,34$). Rizikové alely přinášejí zvýšení rizika o 20 % - 36 %. U polymorfismu rs849135 působí rizikově alela G, která proti manifestaci diabetu naopak působí protektivně.

Retinopatie

Pravděpodobnost poškození sítnice také není významně ($p = 0,42 - 0,55$) ovlivňována variantami polymorfismů rs10203174, rs6819243, rs849135 ani rs1552224. Rizikové alely zvyšují riziko o 15 % - 30 %. U pacientů s retinopatií je více zastoupena alela T polymorfismu rs10203174, která proti projevu T2DM působí protektivně.

Způsob léčby

U polymorfismů rs6819243 a rs849135 nebyly nalezeny signifikantní ($p = 0,45$ resp. $0,14$) rozdíly v rozložení genotypů mezi pacienty s různým způsobem léčby. Homozygot CC polymorfismu rs1020317 má o 89 % zvýšené riziko ($p < 0,05$), že pro něj nebude dostačující léčba pouze dietou. Alela T polymorfismu rs1552224 zvyšuje svému nositeli toto riziko 4,2x ($p = 0,03$).

Hypotézy

Naše hypotézy, že všechny čtyři polymorfismy rs10203174, rs6819243, rs849135 i rs1552224 budou u české populace asociovány s T2DM, se potvrdily pouze u rs1552224, jehož TT homozygoti mají 1,4x zvýšenou pravděpodobnost vzniku onemocnění.

Výsledky naší práce tedy potvrdily fakt, že asociace polymorfismů s onemocněním je velmi populačně specifická. I přes geograficky nevelkou vzdálenost se západoevropská populace od slovanské, středoevropské geneticky odlišuje. Dalším důvodem pro rozdílné míry asociace polymorfismů s onemocněním v různých populacích mohou být i kulturní odlišnosti projevující se povahou životního stylu či jinými stravovacími návyky. Studie Talmud et al., 2014 byla pro replikaci na české populaci vybrána z důvodu nedostupnosti podobně komplexních výzkumů na bližších populacích, než je britská. A právě pro ověření, zda je možno stejné polymorfismy používat pro predikci i u naší populace, tato diplomová práce vznikla. Ve studii Talmud et al., 2014 bylo genotypizováno více 13 tisíc T2DM pacientů. Naše nízké počty analyzovaných osob mohou být dalším důvodem odlišných výsledků. Malé počty mohou být příčinou i nesignifikantních výsledků pro asociace s komplikacemi. Kompenzace diabetu je dnes již velmi účinná. Množství pacientů, u kterých se nějaká komplikace projeví, je tak jen relativně nízké.

Asociace polymorfismu rs1552224 s T2DM byla prokázána v mnoha studiích, na skupinách s různým původem. U ostatních polymorfismů je jen málo dostupných výsledků o jejich rizikovitosti. To může být způsobeno jednak menším počtem studií zaměřených na výzkum těchto polymorfismů, ale i např. fenoménem nepublikování negativních výsledků. Skutečností však je, že u genů, ve kterých se tyto polymorfismy nacházejí, nebyla nalezena žádná biologická souvislost s diabetem, a česká populace nemusí být výjimkou v absenci závislosti těchto polymorfismů s onemocněním.

Predikce

Jedním z důvodů pro zjišťování míry asociace polymorfismů s multifaktoriálně dědičným onemocněním, mezi které patří i T2DM, je možnost predikovat manifestaci nemoci. Jednoznačné řešení takto komplexního problému však neexistuje. Na základě genetického pozadí jsme ale schopni určit procentuální navýšení resp. snížení míry rizika projevu onemocnění pro konkrétního jedince oproti běžné populaci.

Důsledkem aplikace predikčních modelů by mělo být především důsledné dodržování zdravého životního stylu u rizikových osob, které povede ke snížení

pravděpodobnosti projevu onemocnění. Překážek na této cestě je několik. Genetické pozadí T2DM je velice komplexní. Genetická různorodost populací způsobuje, že asociační studie je nutno provádět pro každou populaci zvlášť, rozdílné míry rizikovosti či frekvence alel byly u některých polymorfismů zjištěny i u zdánlivě blízkých skupin.

Pro účinnou prevenci je důležité, aby lidé byli genotypizováni včas, nejpozději na prahu dospělosti. Čím dříve se s kontrolou rizikových osob začne, tím větší efekt intervence má. Otázkou zůstává, zda skutečnost, že člověk bude vědět o svém zvýšeném genetickém riziku, nebude mít na jeho životosprávu dokonce negativní vliv. Důvodem by mohl být subjektivní pocit, že „už je stejně vše ztraceno“. Dalším problémem je fakt, že T2DM nepatří mezi onemocnění, které přinášejí akutní obtíže. Nástup za mnoho let společně s absencí bolesti po manifestaci způsobuje, že číslo určující pravděpodobnost projevu diabetu nemusí být pro většinu lidí hrozba, kvůli které by si měli snižovat „komfort“ plnohodnotného života. Klíčovým faktorem pro úspěch predikčních modelů je proto také dostatečná edukace pacientů.

Aby určení rizika pro konkrétního jedince bylo co nejvíce vypovídající, je třeba do jeho výpočtu zahrnout data z co nejvyššího možného počtu polymorfismů. A právě proto je velice důležité, aby celosvětově docházelo ke sdílení dat, což by bylo nejefektivnější pomocí jedné centrální databáze (Flannick et Florez, 2016). Avšak klasická genetika v současné době nedokáže vysvětlit více než 10 % dědičnosti (Hara et al., 2014a). Proto současné genetické predikční modely nemají příliš velký význam pro klinickou praxi (Lyssenko et Laakso, 2015). Je proto třeba, aby predikční modely začaly brát v úvahu vedle genetiky dále i metabolomiku, epigenomiku, traskriptomiku, proteomiku a epigenetiku ovlivňující expresi genů (Herder et Illig, 2014).

8. Závěr

V rámci této diplomové práce byla provedena genotypizace 4 polymorfismů u 712 pacientů s T2DM a 752 resp. 1034 zdravých kontrol. Polymorfismy rs10203174 *THADA*, rs6819243 *MAEA*, rs849135 *JAZF1* a rs1552224 *ARAPI1* (*CENTD2*) byly pro analýzu vybrány na základě jejich rizikovosti v britské populaci. Na základě získaných dat jsme spočítali hodnotu OR pro rizikové alely u všech námi analyzovaných polymorfismů. Zároveň jsme pomocí výpočtu genetického skóre zjišťovali rizikovost kombinací genotypů. Dále jsme zjišťovali rozdíly v rozložení genotypů u pacientů s komplikacemi a bez nich. Na základě těchto analýz byly vyvozeny následující závěry:

- Genotyp polymorfismu rs10203174 u české populace samostatně statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu T2DM.
- Genotyp polymorfismu rs6819243 u české populace samostatně statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu T2DM.
- Genotyp polymorfismu rs849135 u české populace samostatně statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu T2DM.
- TT homozygot polymorfismu rs1552224 má o téměř 40 % zvýšené riziko projevu T2DM.
- Jedinec, který je v polymorfismech rs10203174, rs6819243, rs849135 a rs1552224 dohromady nositelem maximálně 1 protektivní alely, má 1,3x vyšší riziko T2DM než nositel vícera protektivních alel.
- Genotyp polymorfismu rs10203174 statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu komplikací spojených s T2DM.
- Genotyp polymorfismu rs6819243 statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu komplikací spojených s T2DM.
- Genotyp polymorfismu rs849135 statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu komplikací spojených s T2DM.
- Genotyp polymorfismu rs1552224 statisticky významně neovlivňuje pravděpodobnost projevu nefropatie, neuropatie ani retinopatie. Alela G tohoto polymorfismu přináší o 94 % zvýšené riziko nutnosti amputace nohy při syndromu diabetické nohy.

- Genotyp polymorfismu rs6819243 statisticky významně neovlivňuje způsob nutné léčby T2DM.
- Genotyp polymorfismu rs849135 statisticky významně neovlivňuje způsob nutné léčby T2DM.
- CC homozygot polymorfismu rs10203174 má o téměř 90 % zvýšené riziko, že pro jeho léčbu nebude dostačující pouze dieta.
- Alela T polymorfismu rs1552224 přináší svému nositeli více než čtyřnásobné riziko, že pro jeho léčbu nebude dostačující pouze dieta.

9. Seznam použité literatury

- Abela AG, Fava S. 2013. Does the level of bacterial exposure in early life impact the risk of Type 1 diabetes? *Expert Review of Clinical Immunology*, 9(8):695–697.
- Adamczak DM, Nowak JK, Frydrychowicz M, Kaczmarek M, Sikora J. 2014. The role of Toll-like receptors and vitamin D in diabetes mellitus type 1–A review. *Scandinavian journal of immunology* 80(2):75–84.
- Acharya A, Halemani SS. 2016. Role of vitamin D in diabetes mellitus. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 7(5):1881–1888.
- American Diabetes Association. 2015. 2. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 38(Suppl. 1):S8–S16.
- Basile KJ, Guy VC, Schwartz S, Grant SF. 2014. Overlap of genetic susceptibility to type 1 diabetes, type 2 diabetes, and latent autoimmune diabetes in adults. *Current diabetes reports* 14(11):550.
- Bellamy L, Casas JP, Hingorani AD, Williams D. 2009. Type 2 diabetes mellitus after gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 373(9677):1773–1779.
- Bouwens L, Rooman I. 2005. Regulation of pancreatic beta-cell mass. *Physiological Reviews* 85:1255–1270.
- Broholm C, Olsson AH, Perfilyev A, Hansen NS, Schrölkamp M, Strasko KS, Scheele C, Ribel-Madsen R, Mortensen B, Jørgensen SW. 2016. Epigenetic programming of adipose-derived stem cells in low birthweight individuals. *Diabetologia* 59(12):2664–2673.
- Cífková R, Škodová Z, Bruthans J, Adámková V, Jozífová M, Galovcová M, Wohlfahrt P, Krajcoviechová A, Poledne R, Stávek P et al. 2010. Longitudinal trends in major cardiovascular risk factors in the Czech population between 1985 and 2007/8. *Czech MONICA and Czech post-MONICA. Atherosclerosis* 211(2):676–681.
- Dabelea D, Hanson RL, Lindsay RS, Pettitt DJ, Imperatore G, Gabir MM, Roumain J, Bennett PH, Knowler WC. 2000. Intrauterine exposure to diabetes conveys risks

- for type 2 diabetes and obesity: a study of discordant sibships. *Diabetes* 49(12):2208–2211.
- Das G, Bolusani H. 2016. Hepatitis C virus infection and diabetes. *Practical Diabetes* 33(4):123–128.
- Dayeh T, Volkov P, Salö S, Hall E, Nilsson E, Olsson AH, Kirkpatrick CL, Wollheim CB, Eliasson L, Rönn T et al. 2014. Genome-wide DNA methylation analysis of Human pancreatic islets from type 2 diabetic and non-Diabetic donors identifies candidate genes that influence insulin secretion. *PLoS Genetics* 10(3):e1004160.
- Dimas AS, Lagou V, Barker A, Knowles JW, Mägi R, Hivert MF, Benazzo A, Rybin D, Jackson AU, Stringham HM et al. 2014. Diabetes susceptibility variants on quantitative glycemic traits reveals mechanistic heterogeneity. *Diabetes* 63(6):2158–71.
- Drieschner N, Kerschling S, Soller JT, Rippe V, Belge G, Bullerdiek J, Nimzyk R. 2007. A domain of the thyroid adenoma associated gene (THADA) conserved in vertebrates becomes destroyed by chromosomal rearrangements observed in thyroid adenomas. *Gene* 403(1–2):110–117.
- Dzhambov AM, Dimitrova DD. 2016. Exposures to road traffic, noise, and air pollution as risk factors for type 2 diabetes: A feasibility study in Bulgaria. *Noise Health* 18(82):133–142.
- Fabricio G, Malta A, Chango A, De Freitas Mathias PC. 2016. Environmental contaminants and pancreatic beta-cells. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology* 8(3):257–263.
- Fakhri Y, Sheikhmohammadi A, Bay A, Zandsalimi Y, Moradi B, Avazpour M, Moloudizargari M, Adel M, Mohseni SM, Keramati H. 2016. Association between dichlorodiphenyldichloroethylene in the serum and adipose tissue with type 2 diabetes: A Systematic review and meta-analysis. *Global Journal of Health Science* 9(2):43–54.
- Flannick J, Florez JC. 2016. Type 2 diabetes: genetic data sharing to advance complex disease research. *Nature Reviews. Genetics* 17(9):535–549.

- Fowler MJ. 2008. Microvascular and macrovascular complications of diabetes. *Clinical Diabetes* 26:77–82.
- Gloria–Bottini F, Saccucci P, Manca–Bitti ML, Rapini N, Verrotti A, Neri A, Magrini A, Bottini E. 2014. Type 1 diabetes mellitus. Comparison between the association with PTPN22 genotype and the association with ACP1–ADA1 joint genotype. *Diabetes Research and Clinical Practice* 106:e7–e9.
- Goodarzi MO, Jones MR, Li X, Chua AK, Garcia OA, Chen YD, Krauss RM, Rotter JI, Ankener W, Legro RS et al. 2011. Replication of association of *DENND1A* and *THADA* variants with polycystic ovary syndrome in European cohorts. *Journal of Medical Genetics* 49(2):90–95.
- Gourdy P, Ruidavets JB, Ferrieres J, Ducimetiere P, Amouyel P, Arveiler D, Cotel D, Lamamy N, Bingham A, Hanaire–Broutin H et al. 2001. Prevalence of type 2 diabetes and impaired fasting glucose in the middle–aged population of three french regions – the monica study 1995–97. *Diabetes & Metabolism* 27(3):347–58.
- Grarup N, Sandholt CH, Hansen T, Pedersen O. 2014. Genetic susceptibility to type 2 diabetes and obesity: from genome–wide association studies to rare variants and beyond. *Diabetologia* 57:1528–1541.
- Hall E, Volkov P, Dayeh T, Bacos K, Rönn T, Nitert MD, Ling C. 2014. Effects of palmitate on genome–wide mRNA expression and DNA methylation patterns in human pancreatic islets. *BMC Medicine* 12:103.
- Hanspal M, Smockova Y, Uong Q. 1998. Molecular identification and functional characterization of a novel protein that mediates the attachment of erythroblasts to macrophages. *Blood* 92(8):2940–2950.
- Hara K, Shojima N, Hosoe J, Kadowaki T. 2014a. Genetic architecture of type 2 diabetes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 452:213–220.
- Hara K, Fujita H, Johnson TA, Yamauchi T, Yasuda K, Horikoshi M, Peng C, Hu C, Ma RC, Imamura M et al. 2014b. Genome–wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. *Human Molecular Genetics* 23(1):239–246.

- Harder T, Rodekamp E, Schellong K, Dudenhausen JW, Plagemann A. 2007. Birth weight and subsequent risk of type 2 diabetes: A meta-analysis. *American Journal of Epidemiology* 165(8):849–857.
- Herder C, Illig T. 2014. Neue Biomarker und Gene in der Prädiktion des Typ-2-Diabetes. *Der Diabetologe*: 10(7):566–571.
- Holman N, Young B, Gadsby R. 2015. Current prevalence of type 1 and type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabetic Medicine* 32:1119–1120.
- Chen Z, Fei M, Fu D, Zhang L, Ma Y, Wang Y, Zhang F, Xia Q, Wang X. 2013. Association between cytotoxic T lymphocyte antigen-4 polymorphism and type 1 diabetes: A meta-analysis. *Gene* 516:263–270.
- Cho YS, Chen C-H, Hu C, Long J, Ong RTH, Sim X, Takeuchi F, Wu Y, Go MJ, Yamauchi T. et al. 2011. Meta-analysis of genome-wide association studies identifies 8 new loci for type 2 diabetes in East Asians. *Nature genetics* 44(1):67–72.
- International Diabetes Federation. 2015. *IDF Diabetes Atlas*, 7th edition. Brussels, Belgium.
- Kautzky-Willer A, Harreiter J, Pacini G. 2016. Sex and gender differences in risk, pathophysiology and complications of type 2 diabetes mellitus. *Endocrine Reviews* 37(3):278–316.
- Kim AY, Park YJ, Pan X, Shin KC, Kwak SH, Bassas AF, Sallam RM, Park KS, Alfadda AA, Xu A et al. 2015. Obesity-induced DNA hypermethylation of the adiponectin gene mediates insulin resistance. *Nature Communications* 6:7585.
- Kooner JS, Saleheen D, Sim X, Sehmi J, Zhang W, Frossard P, Been LF, Chia K-S, Dimas AS, Hassanali N et al. 2011. Genome-wide association study in people of South Asian ancestry identifies six novel susceptibility loci for type 2 diabetes. *Nature genetics*. 43(10):984–989.
- Koontz JI, Soreng AL, Nucci M, Kuo FC, Pauwels P, van Den Berghe H, Dal Cin P, Fletcher JA, Sklar J. 2001. Frequent fusion of the JAZF1 and JJAZ1 genes

- in endometrial stromal tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(11):6348–6353.
- Kulzer B, Hermanns N, Krichbaum M, Gorges D, Haak T. 2014. Primäre Prävention des Typ-2-Diabetes durch Lebensstilmodifikation. *Der Diabetologe* 10:276–285.
- Lee JA, Sunwoo S, Kim YS, Yu BY, Park HK, Jeon TH, Yoo BW. 2016. The Effect of sleep quality on the development of type 2 diabetes in primary care patients. *Journal of Korean Medical Science* 31:240–246.
- Ling C, Del Guerra S, Lupi R, Rönn T, Granhall C, Luthman H, Masiello P, Marchetti P, Groop L, Del Prato S. 2008. Epigenetic regulation of PPARGC1A in human type 2 diabetic islets and effect on insulin secretion. *Diabetologia* 51(4):615–622.
- Lyssenko V, Laakso M. 2015. Genetic screening for the risk of type 2 diabetes. Worthless or valuable?. *Diabetes care* 36(Supplement 2):S120–S126.
- Mann JI, De Leeuw I, Hermansen K, Karamanos B, Karlström B, Katsilambros N, Riccardi G, Rivellese AA, Rizkalla S, Slama G et al. 2004. Evidence-based nutritional approaches to the treatment and prevention of diabetes mellitus. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 14(6):373–94.
- Meigs JB, Cupples A, Wilson PWF. 2000. Parental transmission of type 2 diabetes. The Framingham Offspring Study. *Diabetes* 49:2201–2207.
- Meissner T, Marquard J, Schober E. 2010. Maturity-onset diabetes of the young (MODY). *Diabetologe* 6:219–230.
- Miura K, Jacques KM, Stauffer S, Kubosaki A, Zhu K, Hirsch DS, Resau J, Zheng Y, Randazzo PA. 2002. ARAP1: A Point of convergence for Arf and Rho signaling. *Molecular Cell* 9(1):109–119.
- Morris AP, Voight BF, Teslovich TM, Ferreira T, Segrè AV, Steinthorsdottir V, Strawbridge RJ, Khan H, Grallert H, Mahajan A et al. 2012. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nature Genetics* 44(9):981–990.
- Nielsen T, Sparsø T, Grarup N, Jørgensen T, Pisinger C, Witte DR, Hansen T, Pedersen O., Diabetes Genetics Replication and Meta-analysis (DIAGRAM) Consortium. 2011.

- Type 2 diabetes risk allele near CENTD2 is associated with decreased glucose-stimulated insulin release. *Diabetologia* 54(5):1052–1056.
- Oelsner KT, Guo Y, To SB, Non AL, Barkin SL. 2017. Maternal BMI as a predictor of methylation of obesity-related genes in saliva samples from preschool-age Hispanic children at risk for obesity. *BMC Genomics* 18(1):57.
- Östenson CG. 2001. The pathophysiology of type 2 diabetes mellitus: an overview. *Acta Physiologica Scandinavica* 171:241–247.
- Ounissi-Benkalha H, Polychronakos C. 2008. The molecular genetics of type 1 diabetes: new genes and emerging mechanisms. *Trends in Molecular Medicine* 14(6):268–275.
- Pereira PF, Alfenas RCG, Araújo RMA. 2014. Does breastfeeding influence the risk of developing diabetes mellitus in children? A review of current evidence. *Jornal de Pediatria* 90(1):7–15.
- Piepoli MF, Hoes AW, Agewall S, Albus C, Brotons C, Catapano AL, Cooney MT, Corrà U, Cosyns B, Deaton C et al. 2016. 2016 European guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: The Sixth joint task force of the European Society of Cardiology and other societies on cardiovascular disease prevention in clinical practice (constituted by representatives of 10 societies and by invited experts). *European Heart Journal* 37:2315–2381.
- Portuesi R, Pozzilli P, Boehm B, Buzzetti R, Filippi S. 2013. Assessment of type 1 diabetes risk conferred by HLA DRB1, INS–VNTR and PTPN22 genes using the Bayesian network approach. *PLoS ONE* 8(11):e79506.
- Poulsen P, Vaag AA, Kyvik KO, Møller Jensen D, Beck-Nielsen H. 1997. Low birth weight is associated with NIDDM in discordant monozygotic and dizygotic twin pairs. *Diabetologia* 40(4):439–446.
- Qian Y, Dong M, Lu F, Li H, Jin G, Hu Z, Shen C, Shen H. 2015. Joint effect of CENTD2 and KCNQ1 polymorphisms on the risk of type 2 diabetes mellitus among Chinese Han population. *Molecular and Cellular Endocrinology* 407:46–51.

- Ravelli ACJ, van der Meulen JHP, Michels RPJ, Osmond C, Barker DJP, Hales CN, Bleker OP. 1998. Glucose tolerance in adults after prenatal exposure to famine. *The Lancet* 351:173–177.
- Rees SD, Hydrie MZ, Shera AS, Kumar S, O'Hare JP, Barnett AH, Basit A, Kelly MA. 2011. Replication of 13 genome-wide association (GWA)-validated risk variants for type 2 diabetes in Pakistani populations. *Diabetologia* 54(6):1368–1374.
- Roberts AL, Agnew-Blais JC, Spiegelman D, Kubzansky LD, Mason SM, Galea S, Hu FB, Rich-Edwards JW, Koenen KC. 2015. Posttraumatic stress disorder and incidence of type 2 diabetes mellitus in a sample of women: A 22-year longitudinal study. *JAMA Psychiatry* 72(3):203–210.
- Saltiel AR, Kahn CR. 2001. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* 414:799–806.
- Saxena R, Voight BF, Lyssenko V, Burt NP, de Bakker PI, Chen H, Roix JJ, Kathiresan S, Hirschhorn JN, Daly MJ et al. 2007. Genome-wide association analysis identifies loci for type 2 diabetes and triglyceride levels. *Science* 316(5829):1331–1336.
- Seino Y, Nanjo K, Tajima N, Kadowaki T, Kashiwagi A, Araki E, Ito C, Inagaki N, Iwamoto Y, Kasuga M, et al. 2010. Report of the committee on the classification and diagnostic criteria of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes Investigation* 1(5):212–228.
- Sing S, Usman K, Banerjee M. 2016. Pharmacogenetic studies update in type 2 diabetes mellitus. *World Journal Diabetes* 7(15):302–315.
- Talmud PJ, Cooper JA, Morris RW, Dudbridge F, Shah T, Engmann J, Dale C, White J, McLachlan S, Zabaneh D, et al. 2014. Sixty-five common genetic variants and prediction of type 2 diabetes. *Diabetes* 63: doi: 10.2337/db14-1504.
- Tentolouris N, Andrianakos A, Karanikolas G, Karamitsos D, Trontzas P, Krachtis P, Christoyannis F, Tavaniotou E, Nikolia Z, Kaskani E et al. 2012. Type 2 diabetes mellitus is associated with obesity, smoking and low socioeconomic status in large and representative samples of rural, urban, and suburban adult Greek populations. *Hormones* 11(4):458–467.

- The HAPO Study Cooperative Research Group. 2008. Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *The New Engl Journal of Medicine* 358:1991–2002.
- Tong Y, Lin Y, Zhang Y, Yang J, Zhang Y, Liu H, Zhang B. 2009. Association between TCF7L2 gene polymorphisms and susceptibility to Type 2 Diabetes Mellitus: a large Human Genome Epidemiology (HuGE) review and meta-analysis. *BMC Medical Genetics* 10:15.
- Travers ME, Mackay DJ, Dekker Nitert M, Morris AP, Lindgren CM, Berry A, Johnson PR, Hanley N, Groop LC, McCarthy MI et al. 2013. Insights into the molecular mechanism for type 2 diabetes susceptibility at the KCNQ1 locus from temporal changes in imprinting status in human islets. *Diabetes* 62(3):987–992.
- Vella A, Cooper JD, Lowe CE, Walker N, Nutland S, Widmer B, Jones R, Ring SM, McArdle W, Pembrey ME et al. 2005. Localization of a type 1 diabetes locus in the IL2RA/CD25 region by use of tag single-nucleotide polymorphisms. *American journal of human genetics* 76(5):773–779.
- Voight BF, Scott LJ, Steinthorsdottir V, Morris AP, Dina C, Welch RP, Zeggini E, Huth C, Aulchenko YS, Thorleifsson G et al. 2010. Twelve type 2 diabetes susceptibility loci identified through large-scale association analysis. *Nature Genetics* 42(7):579–589.
- Wändell PE, Carlsson AC. 2014. Gender differences and time trends in incidence and prevalence of type 2 diabetes in Sweden – A model explaining the diabetes epidemic worldwide today?. *Diabetes Research and Clinical Practice* 106:e90–e92.
- Wei X, E M, Yu S. 2015. A meta-analysis of passive smoking and risk of developing Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Research and Clinical Practice* 107(1):9–14.
- World Health Organization. 2006. Definition and diagnosis of diabetes mellitus and intermediate hyperglycemia: report of a WHO/IDF consultation. Geneva, Switzerland.
- Yao B, Fang H, Xu W, Yan Y, Xu H, Liu Y, Mo M, Zhang H, Zhao Y. 2014. Dietary fiber intake and risk of type 2 diabetes: a dose-response analysis of prospective studies. *European Journal of Epidemiology* 28(11):845–858.

- Yasuda K, Miyake K, Horikawa Y, Hara K, Osawa H, Furuta H, Hirota Y, Mori H, Jonsson A, Sato Y et al. 2008. Variants in KCNQ1 are associated with susceptibility to type 2 diabetes mellitus. *Nature Genetics* 40(9):1092–1097.
- Yuasa K, Aoki N, Hijikata T. 2015. JAZF1 promotes proliferation of C2C12 cells, but retards their myogenic differentiation through transcriptional repression of MEF2C and MRF4 —Implications for the role of Jazf1 variants in oncogenesis and type 2 diabetes. *Experimental Cell Research* 336:287–297.
- Zia A, Bhatti A, John P, Kiani AK. 2015. Data interpretation: deciphering the biological function of Type 2 diabetes associated risk loci. *Acta Diabetologica* 52:789–800.
- Zug O, Hechter E, Sunyaev SR, Lander ES. 2011. The mystery of missing heritability: Genetic interactions create phantom heritability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(4):1193–1198.

9.1. Internetové zdroje

- URL1: ÚZIS ČR, <http://www.uzis.cz/publikace/zdravotnictvi-cr-strucny-prehled-cinnosti-oboru-diabetologie-endokrinologie-za-období-2007-2015>, citováno 11.4.2017.
- URL2: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=10203174, citováno 11.4.2017.
- URL3: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=6819243, citováno 11.4.2017.
- URL4: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=849135, citováno 11.4.2017.
- URL5: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1552224, citováno 11.4.2017.

10. Přílohy

Příloha č. 1: Posterové sdělení výsledků této diplomové práce prezentované na 53. diabetologických dnech v Luhačovicích pořádaných Českou diabetologickou společností.

Polymorfismy v genech *THADA*, *MAEA*, *JAZF1* a *ARAP1* a riziko rozvoje diabetes mellitus 2. typu



Procházková I.^{1,2}, Pelikánová T.¹, Adámková V.¹, Hubáček J.A.¹

¹ Institut klinické a experimentální medicíny, Praha
² Přírodovědecká fakulta UK, Praha



ÚVOD

Diabetes mellitus druhého typu (T2DM) je spojován především s environmentálními rizikovými faktory, ale i genetické pozadí hraje významnou roli. Cílem naší práce bylo zjistit souvislost 4 polymorfismů s rizikem vzniku T2DM u české populace. Polymorfismy rs10203174 *THADA*, rs6819243 *MAEA*, rs849135 *JAZF1* a rs1552224 *ARAP1* jsme vybrali na základě jejich rizikovosti v britské populaci.

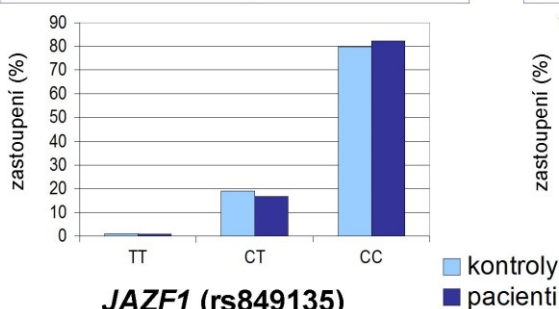
METODIKA

Studovali jsme skupiny celkem 710 českých pacientů s T2DM a 724 zdravých kontrol, vybraných jako náhodný vzorek české populace ve studii post-MONICA. Genotypizace rs10203174 a rs6819243 probíhala analýzou PCR-RFLP. Analýza genotypů rs849135 a rs1552224 byla provedena pomocí real-time PCR. Výsledky byly analyzovány výpočtem odds ratio (OR) a chí-kvadrátu.

VÝSLEDKY

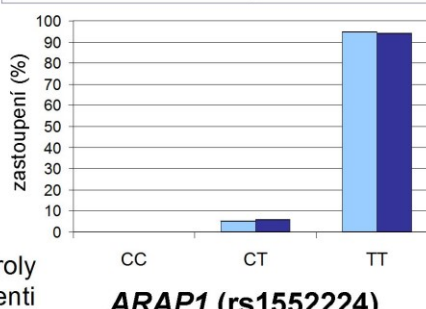
THADA (rs10203174)

OR = 1,20 (95% CI 0,91 – 1,56)
P = 0,20



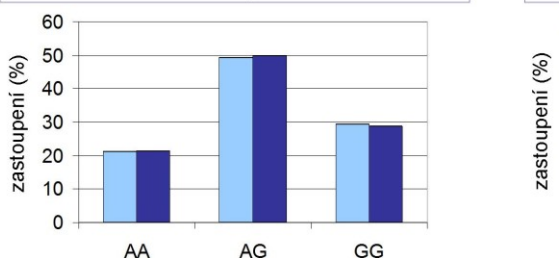
MAEA (rs6819243)

OR = 1,12 (95% CI 0,71 – 1,77)
P = 0,61



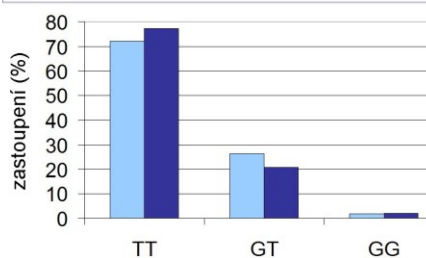
JAZF1 (rs849135)

OR = 1,03 (95% CI 0,76 – 1,38)
P = 0,86



ARAP1 (rs1552224)

OR = 1,37 (95% CI 1,07 – 1,75)
P = 0,01



ZÁVĚR

Výsledky naznačují, že varianty rs10203174, rs6819243 a rs849135 u české populace nijak neovlivňují riziko manifestace T2DM. Rs1552224 TT homozygoti mají 1,4x zvýšenou pravděpodobnost vzniku onemocnění.

Podpořeno MZ ČR – RVO („Institut klinické a experimentální medicíny – IKEM, IČ 00023001“).
iveta.prochazkova@natur.cuni.cz

Příloha č. 2: Kopie programu 53. diabetologických dní v Luhačovicích pořádaných Českou diabetologickou společností.



7. 4. 2017

13.15 - 14.15

Prostor A:

PÁTEK**ŘÍZENÁ DISKUSE U POSTERŮ****26 - 35 KOMPLIKACE**

moderují: M. Koliba, V. Fejfarová

Prostor B:

36 - 45 PATOFYZIOLOGIE

moderují: B. Bendlová, O. Cinek

13.15 - 14.15

Prostor A:

ŘÍZENÁ DISKUSE U POSTERŮ**26 - 35 KOMPLIKACE**

moderují: M. Koliba, V. Fejfarová

26 Vliv diabetu mellitu 1. typu na reprodukci mužůS. Stádníková, K. Štechová, L. Mastíková, G. Pavlíková, P. Paulasová, L. Hoskvcová, M. Kvapil /Praha/**27 Faktory ovlivňující saturaci hemoglobinu kyslíkem v retinálních cévách u osob s diabetem - studie ROXINEGLYD**P. Mičák, R. Chlup, M. Šín, P. Kudlová, O. Krystyník, M. Král, V. Kubičková, J. Zapletalová /Olomouc/**28 Kardiální autonomní neuropatie přispívá ke ztluštění karotické intimy a podílí se tak na rozvoji aterosklerózy u diabetiků 1. typu**Š. Malá, L. Hoskvcová, V. Potočková, P. Piňhová, J. Brabec, J. Kulhánková, L. Riedlbauchová, M. Kvapil, J. Brož /Praha/**29 Využití ortézy typu Sarmiento k hojení neuropatických defektů a Charcotovo osteoartropatie u pacientů s diabetes mellitus 2. typu**M. Žourek, M. Šágl, J. Žourková /Plzeň/**30 Prognostická hodnota scintigrafie značenými leukocyty u pacientů se syndromem diabetické nohy**O. Lang, I. Kuniková, H. Matonohová, E. Šilhová, A. Kratochvíl, K. Petrová /Praha/**31 Syndrom diabetické nohy neuroischemické etiologie a vliv rheoferézní terapie - pilotní studie**P. Piňhová, L. Vitová, M. Horácková, J. Piňha, M. Kvapil /Praha/

32

32 Výskyt syndromu obstrukční spánkové apnoe a jeho možná asociace s makrovaskulárními komplikacemi, poruchou mikrocirkulace a hojením u pacientů se syndromem diabetické nohy
V. Fejfarová, M. Klementová, J. Polák, A. Jirkovská, R. Bém, M. Dubský, V. Wosková, A. Němcová, A. Pyšná, E. Vrátná, M. Křížová, V. Lánská /Praha/**33 Dlouhodobý efekt buněčné terapie kritické končetinové ischemie u pacientky s diabetem 1. typu-kazuistika**A. Pyšná, R. Bém, A. Jirkovská, A. Němcová, V. Fejfarová, V. Wosková, K. Navrátil, B. Sixta, M. Dubský /Praha/**34 Variabilita srdeční frekvence u pacientů s diabetem 1. typu souvisí s mikrovaskulární reaktivitou**T. Pelc, J. Škrha jr., J. Šoupal, M. Flekač, J. Škrha, M. Prázný /Praha/**35 Vývoj kostní hustoty u pacientů zařazených na čekací listinu ke kombinované transplantaci ledviny a slinivky (retrospektivní analýza)**S. Kratochvílová, J. Brunová /Praha/

13.15 - 14.15

ŘÍZENÁ DISKUSE U POSTERŮ

Prostor B:

36 - 45 PATOFYZIOLOGIE

moderují: B. Bendlová, O. Cinek

36 Úloha hnědé tukové tkáně v patogenetice metabolického syndromuV. Škop, J. Trnovská, M. Hüttel, K. Sedová, H. Malínská, O. Oliyarnyk, I. Marková, L. Kazdová /Praha/**37 In vitro stanovení aktivní sekrece visfatinu u makrofágů, adipocytů a hepatocytů**P. Svoboda, D. Rayová, J. Zídková, M. Haluzík, V. Škop /Praha/**38 Využití dynamických metod magnetické rezonance ke stanovení krevní perfúze pankreatu**R. Straková, J. Gojda, A. Pilhalová, J. Weichet, L. Večeřová, M. Anděl /Praha/**39 Incidence hypovitaminózy D u neselektované populace pacientů s diabetes mellitus v závislosti na ročním období**D. Janíčková Žďárská, J. Brož, T. Franěk, M. Kvapil /Praha/

33

40 Vliv podváhy na lačné a glukózou stimulované hladiny cytokinů u žen s předešlou diagnózou gestačního diabetu
M. Vaňková, D. Vejražková, P. Lukášová, O. Lischková, G. Vacínová, J. Včelák, B. Bendlová /Praha/**41 Polymorfismy v genech THADA, MAEA, JAZF1 a ARAP1 a riziko rozvoje diabetes mellitus 2. typu**L. Procházková, T. Pelikánová, V. Adámková, J. Hubáček /Praha/**42 Genetická determinace diabetu druhého typu v české populaci**L. Dlouhá, T. Pelikánová, V. Adámková, J. A. Hubáček /Praha/**43 In vitro analýza GCK-MODY mutací odhalující substituce, které nemají vliv na funkci a stabilitu glukokinázy**M. Těšínský, D. Šimčíková, L. Kocková, P. Heneberg /Praha/**44 Predikce fenotypu mutací v glukokinase asociovaných s GCK-MODY: komparativní studie in vitro experimentů s in silico predikcí**D. Šimčíková, M. Těšínský, P. Heneberg /Praha/**45 Čeští LADA pacienti nevykazují samostatnou pozitivitu na autoprotilátky proti ZnT8, ale tyto protilátky jsou využitelné pro diferenciální diagnózu autoimunitního a MODY diabetu**
P. Heneberg, D. Šimčíková, M. Čecháková, M. Anděl /Praha/

34

35